

**TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS MESENQUIMAIS  
POR VIA INTRACORONÁRIA: CONTRIBUTOS DO  
ESTUDO INVASIVO DA  
MICROCIRCULAÇÃO CORONÁRIA**

**ANTÓNIO JOSÉ FIARRESGA**

**Tese para obtenção do grau de Doutor em Medicina  
na Especialidade de Investigação Clínica  
na Faculdade de Ciências Médicas**

**Setembro, 2015**



**CELL THERAPY WITH INTRACORONARY DELIVERED  
MESENCHYMAL STEM CELL:  
INSIGHTS FORM THE INVASIVE ASSESSMENT OF  
CORONARY MICROCIRCULATION**





Para a minha Mãe.



**A presente tese deu origem às seguintes publicações:**

O ÍNDICE DE RESISTÊNCIA MICROCIRCULAÇÃO PARA O ESTUDO INVASIVO DA MICROCIRCULAÇÃO CORONÁRIA – DESCRIÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MODELO ANIMAL

**António Fiarresga**, Mafalda Selas, Eunice Oliveira, Sandra Cavaco-Gonçalves, Duarte Cacela, Belmira Carrapiço, Nuno Cardim, Rui Cruz Ferreira.

Rev Port Cardiol. 2014 Apr;33(4):207-12.

INTRACORONARY DELIVERY OF HUMAN MESENCHYMAL/STROMAL STEM CELLS: INSIGHTS FROM CORONARY MICROCIRCULATION INVASIVE ASSESSMENT

**António Fiarresga**, Márcia Mata, Sandra Cavaco-Gonçalves, Mafalda Selas, Irina Simões, Eunice Oliveira, Belmira Carrapiço, Nuno Cardim, Joaquim Sampaio Cabral, Rui Cruz Ferreira, Cláudia Lobato da Silva

Aceite para publicação na revista PLOS ONE

Um terceiro artigo intitulado THE INDEX OF MICROCIRCULATORY RESISTANCE FOR OPTIMIZING THE USE OF INTRACORONARY DELIVERY OF MESENCHYMAL STEM CELLS, encontra-se em elaboração para ser apresentado em breve.



O candidato foi responsável pelo desenho do projeto de estudos, pela sua implementação logística, cateterização e estudo invasivo dos animais, criação da base de dados, processamento estatístico e redação dos artigos.

O isolamento, expansão e caracterização celular foi realizado pelos investigadores do Laboratório de Bioengenharia de Células Estaminais e Medicina Regenerativa, Instituto Superior Técnico, Lisboa.

O estudo anatomopatológico e a avaliação histológica foram realizados pelos investigadores da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa.

**Orientador:**

Prof. Dr. Nuno Miguel Albuquerque e Castro de Almeida Cardim



## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

ABCD	Autologous Bone Marrow Cells in Dilated Cardiomyopathy
ADVANCE	Adipose Derived Regenerative Cells (ADRCs) Delivered Via the Intracoronary Route in the Treatment of Patients With ST-elevation Acute Myocardial Infarction
ALCADIA	AutoLogous Human Cardiac Derived Stem Cell to Treat Ischemic cArdiomyopathy
APOLLO	AdiPOse derived Stem ceLLs in the Treatment of Patients With ST elevation myOcardial Infarction
ASTAMI	Autologous Stem cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction
AVAQ	Anos de Vida Ajustados pela Qualidade
BAMI	Bone Acute Myocardial Infarction
BMP	Batimento Por Minuto
BNP	Peptídeo Natriurético Cerebral
BOOST	BOne marrOw transfer to enhance ST elevation infarct regeneration
CADUCEUS	Cardiosphere Derived aUtologous stem Cells to reverse ventricUlar dySfunction
CCS	Canadian Cardiovascular Society
CCTRN	Cardiovascular Cell Therapy Research Network
C-CURE	Cardiopietic stem Cell therapy in heart failURE
CDI	Cardioversor Desfibrilhador Implantável
CEC	Células Estaminais Cardíacas
CEH	Células Estaminais Hematopoiéticas
CEM	Células Estaminais Mesenquimais
CFU	Colony Forming Units
CEPi	Células Estaminais Pluripotentes induzidas
CMD	Cardiomiopatia Dilatada
CMNMO	Células Mononucleares derivadas da Medula Óssea
CMO	Células derivadas da Medula Óssea
CPCs	Células Progenitoras derivadas do Sangue Periférico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

EAM	Enfarte Agudo do Miocárdio
FEVE	Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo
FFR	Fluxo Fracionado de Reserva do Miocárdio
FINCELL	FINnish study of autologous bone marrow-derived stem CELLs in acute myocardial infarction
FOCUS-CCTRN	First Mononuclear Cells injected in the United States
FOCUS-HF	First Mononuclear Cells injected in the United States – Heart Failure
GENESIS	ReGENerative Effect of Stem cell therapy in myocardial Infarction Study
GRACE	Global Registry of Acute Coronary Events
G-CSF	Fator de estimulação de Colônias de Granulócitos
HEBE	Intracoronary infusion of autologous mononuclear bone marrow cells or peripheral mononuclear blood cells after primary PCI
IACT	Intracoronary Autologous Bone Marrow Cell Transplantation in Chronic Coronary Artery Disease
ICP	Intervenção Coronária Percutânea
IECA	Inibidores do Enzima de Conversão da Angiotensina
IRM	Índice de Resistência da Microcirculação
LateTIME	Transplantation In Myocardial Infarction Evaluation
MAGIC	Myocardial Regeneration and Angiogenesis in Myocardial Infarction with G-CSF and Intracoronary Stem Cell Infusion
MSC-HF	Mesenchymal Stromal Cells in chronic ischemic Heart Failure
NT-proBNP	porção N-terminal do Peptídeo Natriurético Cerebral
NYHA	New York Heart Association
POSEIDON	PercutaneOus StEm Cell Injection Delivery Effects On Neomyogenesis
PROMETHEUS	Prospective Randomized Study of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Patients Undergoing Cardiac Surgery
REGENT	Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction
RENEW	Intramyocardial Delivery of Auto CD34+ Stem Cells for Improving Exercise Capacity in Subjects With Refractory Angina



REPAIR-AMI	Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction
RFC	Reserva de Fluxo Coronário
RMC	Ressonância Magnética Cardíaca
RMh	Resistência Microvascular hiperêmica
RPM	Rotações Por Minuto
SCIPIO	Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy
SDF-1 $\alpha$	Fator Derivado de Células do Estroma
SEISMIC	Safety and Effects of Implanted (Autologous) Skeletal Myoblasts using an Injection Catheter
SPECT	Tomografia Computorizada por Emissão de Fotão Único
SWISS-AMI	Swiss Multicenter Intracoronary Stem Cells Study in Acute Myocardial Infarction
STAR-Heart	Stem cell Transplantation in patients with chronic heARt failure
TACT-HFT	Transendocardial Autologous Cells in Ischemic Heart Failure
TIMI	Thrombolysis In Myocardial Infarction
TOPCARE-AMI	Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction
TOPCARE-CHD	Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Coronary Heart Disease
TOPCARE-DCM	Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Dilated Cardiomyopathy



## RESUMO

### Introdução

A utilização de células e das suas propriedades para o tratamento das doenças cardiovasculares, é uma promessa para o futuro e talvez a única forma de ultrapassar algumas das insuficiências das terapêuticas atuais. A via de entrega das células mais utilizada na investigação tem sido a intracoronária, ganhando a microcirculação especial relevância, por ser onde ocorre a primeira interação com o tecido nativo. As células estaminais mesenquimais (CEM) têm propriedades que as tornam particularmente aptas para a Terapia Celular, mas as suas dimensões, superiores ao diâmetro dos capilares, tem motivado controvérsia quanto à sua entrega intracoronária. A cardiologia de intervenção tem atualmente técnicas que permitem a avaliação em tempo real e *in vivo* do estado da microcirculação coronária. A determinação do índice da resistência da microcirculação (IRM) fornece informação sobre a circulação dos pequenos vasos, de forma independente da circulação coronária e do estado hemodinâmico, mas a aplicabilidade clínica deste conhecimento encontra-se ainda por definir.

### Objectivos

Esclarecer o potencial do IRM no estudo dos efeitos do transplante de CEM por via intracoronária.

### População e Métodos

Estudo pré-clínico com modelo animal (suíno) desenvolvido em 3 fases.

Na Primeira Fase foram utilizados 8 animais saudáveis para estudar e validar a técnica de determinação de estudo da microcirculação. Efetuou-se a determinação do IRM com duas doses diferentes de papaverina para a indução da resposta hiperémica máxima (5 e 10 mg) e após a disfunção da microcirculação com injeção intracoronária de microesferas de embozene com 40 µm de diâmetro.

Na Segunda Fase foram utilizados 18 animais saudáveis, randomizados em grupo controlo e grupo recetor de  $30 \times 10^6$  CEM por via intracoronária. Foram avaliados de forma cega o IRM, a pressão aórtica, o fluxo coronário epicárdico e a ocorrência de alterações electrocardiográficas.

Na Terceira Fase foram utilizados 18 animais, com enfarte agudo do miocárdio provocado (EAM), randomizados em grupo controlo, grupo recetor de CEM expandidas de forma convencional e grupo recetor de CEM expandidas com metodologia inovadora e de menores dimensões. Foi realizada uma exploração da dose/efeito com infusão faseada de  $10 \times 10^6$ ,  $15 \times 10^6$  e  $20 \times 10^6$  CEM, com determinação do IRM, da pressão aórtica, do fluxo coronário epicárdico e da ocorrência de alterações eletrocardiográficas. Quatro semanas após a entrega das células foi novamente avaliado o IRM e foi efetuado o estudo anatomopatológico dos animais na procura de evidência de neoangiogénese e de regeneração miocárdica, ou de um efeito positivo da resposta reparadora após o enfarte.

### Resultados

Nas 3 fases todos os animais mantiveram estabilidade hemodinâmica e eletrocardiográfica, com exceção da elevação de ST de V1-V3 verificada após a injeção das microesferas.

Na Primeira Fase as duas doses de papaverina induziram uma resposta hiperémica eficaz, sem tradução com significado na determinação do IRM (variação da pressão distal de  $-11,4 \pm 5$  e de  $-10,6 \pm 5$  mmHg com as doses de 5 e 10 mg respetivamente ( $p=0,5$ ). Com a injeção das microesferas o IRM teve uma elevação média de  $310 \pm 190$  %, para um valor médio de  $41,3 \pm 16$  U ( $p = 0,001$ ).

Na Segunda Fase não houve diferenças significativas dos parâmetros hemodinâmicos, do fluxo epicárdico e da avaliação eletrocardiográfica entre os dois grupos. O IRM de base foi semelhante e após a infusão intracoronária observou-se uma elevação expressiva do IRM nos animais que receberam células em comparação com o grupo controlo ( $8,8 \text{ U} \pm 1$  vs.  $14,2 \text{ U} \pm 1,8$ ,  $P=0,02$ ) e quanto ao seu valor de base (aumento de 112%,  $p=0,008$ ).

Na terceira Fase não houve novamente diferenças significativas dos parâmetros hemodinâmicos, do fluxo epicárdico e da avaliação eletrocardiográfica entre os três grupos. Houve uma elevação do IRM nos animais que receberam células a partir da 2ª dose (72% nas células convencionais e 108% nas células inovadoras) e que se manteve com a 3ª dose (100% nas células convencionais e 88% nas inovadoras) com significado estatístico em comparação com o grupo controlo ( $p=0,034$  com a 2ª dose e  $p=0,024$  com a 3ª dose). Quatro semanas após a entrega das CEM observou-se a descida do IRM nos dois grupos que receberam células, para valores sobreponíveis aos do grupo controlo e aos valores pós-EAM. Na avaliação anatomopatológica e histológica dos corações explantados não houve diferenças entre os três grupos.

### Conclusões

O IRM permite distinguir alterações da microcirculação coronária motivadas pela entrega intracoronária de CEM, na ausência de alterações de outros parâmetros clínicos da circulação coronária utilizados em tempo real. As alterações do IRM são progressivas e passíveis de avaliar o efeito/dose, embora não tenha sido possível determinar diferenças com os dois tipos de CEM. No nosso modelo a injeção intracoronária não se associou a evidência de efeito benéfico na reparação ou regeneração miocárdica após o EAM.



## ABSTRACT

### Introduction

The use of cells for the treatment of cardiovascular disease is a promise for the future and perhaps the only option to overcome some of the shortcomings of current therapies. The strategy for the delivery of cells most often used in current research has been the intracoronary route and due to this microcirculation gains special relevance, mainly because it is the first interaction site of transplanted cells with the native tissue. Mesenchymal stem cells (MSC) have properties that make them suitable for Cell Therapy, but its dimensions, larger than the diameter of capillaries, have prompted controversy about the safety of intracoronary delivery. The interventional cardiology currently has techniques that allow for real-time and in vivo assessment of coronary microcirculation state. The determination of the index of microcirculatory resistance index (IMR) provides information about small vessels, independently of the coronary circulation and hemodynamic status, but the clinical applicability of this knowledge is yet to be defined.

### Objectives

To clarify the potential use of IMR in the study of the effects of MSC through intracoronary transplantation.

### Population and Methods

Preclinical study with swine model developed in three phases.

In Phase One 8 healthy animals were used to study and validate the IMR assessment in our animal model. IMR was assessed with two different doses of papaverine for inducing the maximal hyperaemic response (5 and 10 mg) and microcirculation dysfunction was achieved after intracoronary injection with embozene microspheres with 40  $\mu$ m in diameter.

In Phase Two we randomized 18 healthy animals divided between the control group and the one receiving  $30 \times 10^6$  MSC through an intracoronary infusion. There we blindly evaluated IMR, the aortic pressure, the epicardial coronary flow and the occurrence of ECG changes.

In Phase Three we used 18 animals with a provoked acute myocardial infarction (AMI), randomized into a control group, a MSC expanded conventionally receiver group and a MSC expanded with an innovative methodology receiver group. There was a stepwise infusion with doses of  $10 \times 10^6$ ,  $15 \times 10^6$  and  $20 \times 10^6$  MSC with determination of IMR, the aortic pressure, the epicardial coronary flow and occurrence of electrocardiographic abnormalities. Four weeks after cell delivery we again measured the IMR and proceeded with the pathological study of animals in the search for evidence of neoangiogenesis and myocardial regeneration, or a positive effect in the reparative response following the infarction.

### Results

All animals remained hemodynamically stable and with no electrocardiographic abnormalities, except for the ST elevation in V1-V3 observed after injection of the microspheres.

In Phase One the two doses of papaverine achieved an hyperemic and effective response without significant differences in IMR (variation of the distal pressure  $-11.4 \pm 5$  and  $-10.6 \pm 5$  mmHg with the doses of 5 and 10 mg respectively ( $p = 0.5$ ). With the injection of the microspheres the IMR had an average increase of  $310 \pm 190\%$  for an average value of  $41.3 \pm 16$  U ( $p = 0.001$ ).

In the second phase there were no significant differences in hemodynamic parameters, epicardial flow and electrocardiographic assessment between the two groups. The baseline IMR was similar and after intracoronary infusion there was a significant increase in animals receiving cells compared with the control group ( $8.8 \pm 1$  vs.  $14.2 \pm 1.8$ ,  $p = 0.02$ ) and with their baseline (112% increase,  $p = 0.008$ ).

In the third phase again there were no significant differences in hemodynamic parameters, the epicardial flow and electrocardiographic evaluation between the three groups. There was a significant increase in IMR in animals that received cells from the 2<sup>nd</sup> dose (72% in conventional cells and 108% in the innovative cells) that remained with the 3<sup>rd</sup> dose (100% in conventional cells and 88% in the innovative) with statistical significance compared with the control group ( $p = 0.034$  with 2<sup>nd</sup> dose,  $p = 0.024$  with 3<sup>rd</sup> dose). Four weeks after delivery of the MSC we observed the fall of the IMR in the two groups that received cells with values overlapping those of the control group. In pathological and histological evaluation of removed hearts there were no differences among the three groups.

### Conclusions

The IMR allows for the differentiation of changes in coronary microcirculation motivated by intracoronary delivery of MSC in the absence of modification in other clinical parameters. IMR changes are progressive and enable the evaluation of the effect / dose, though it has not been possible to determine differences in the two types of MSC. In our model, intracoronary injection of MSC was not associated with evidence of repair or myocardial regeneration after AMI.



# ÍNDICE

<b>I. INTRODUÇÃO</b>	<b>23</b>
<b>II. FUNDAMENTOS</b>	<b>31</b>
<b>1. Terapia Celular Em Cardiologia – O Estado Da Arte</b>	<b>31</b>
<b>1.1 Doenças Cardíacas E O Potencial Da Terapia Celular</b>	<b>31</b>
1.1.1 O impacto da doença cardiovascular	31
1.1.2 Doenças cardíacas e as limitações das terapêuticas atuais	34
1.1.2.1 Insuficiência cardíaca e remodelação ventricular	35
1.1.2.2 Enfarte agudo do miocárdio	39
1.1.2.3 Doença isquêmica crônica	43
1.1.2.4 Cardiomiopatia dilatada não isquêmica	46
<b>1.2 Requisitos para o sucesso da terapia celular cardíaca</b>	<b>47</b>
<b>1.3 Células Estaminais E Medicina Regenerativa</b>	<b>49</b>
1.3.1 Considerações gerais	49
1.3.2 Células estaminais embrionárias	53
1.3.3 Células estaminais pluripotentes induzidas	54
1.3.4 Células estaminais do músculo esquelético	55
1.3.5 Células estaminais hematopoiéticas	57
1.3.6 Células estaminais mesenquimais	61
1.3.7 Células estaminais cardíacas	65
1.3.8 Outras células estaminais	68
<b>1.4 Métodos De Entrega Das Células</b>	<b>71</b>
1.4.1 Injeção intramiocárdica transepicárdica	72
1.4.2 Injeção intramiocárdica transendocárdica	73
1.4.3 Injeção intracoronária arterial	74
1.4.4 Injeção venosa coronária por via retrógrada	76
1.4.5 Injeção venosa periférica	76
1.4.6 Riscos da injeção intracoronária de células mesenquimais	77
<b>1.5 Investigação Clínica Atual Em Terapia Celular</b>	<b>79</b>
1.5.1 Considerações gerais	79
1.5.2 Investigação no enfarte agudo do miocárdio	81
1.5.2.1 Células estaminais hematopoiéticas	81
1.5.2.2 Células estaminais mesenquimais	93
1.5.2.3 Células estaminais cardíacas	96
1.5.3 Investigação na cardiomiopatia isquêmica crônica	97
1.5.3.1 Células estaminais hematopoiéticas	97
1.5.3.2 Células estaminais do músculo esquelético	102
1.5.3.3 Células estaminais mesenquimais	104
1.5.3.4 Células estaminais cardíacas	106
1.5.4 Investigação na cardiomiopatia dilatada	107
1.5.5 Considerações finais e um futuro com muitas questões	110
<b>2. Avaliação Invasiva Da Microcirculação Coronária</b>	<b>111</b>
2.1 Características da microcirculação coronária	112
2.2 Relevância da microcirculação coronária para a Terapia Celular	114
2.3 A avaliação da resistência microvascular	116
<b>3. Modelo Animal Para Investigação Pré-Clínica</b>	<b>121</b>
3.1 Translação dos estudos animais pré-clínicos	122
3.2 Modelo animal de grande porte para investigação em Cardiologia	123
<b>III. HIPÓTESE</b>	<b>127</b>

<b>IV. OBJETIVOS</b>	<b>131</b>
<b>1. Primeira Fase</b>	<b>131</b>
1.1 Objetivo principal	131
1.2 Objetivos secundários	131
<b>2. Segunda Fase</b>	<b>132</b>
2.1 Objetivo principal	132
2.2 Objetivos secundários	132
<b>3. Terceira Fase</b>	<b>132</b>
3.1 Objetivo principal	132
3.2 Objetivos secundários	133
<b>V. MÉTODOS</b>	<b>137</b>
<b>1. Primeira Fase</b>	<b>137</b>
1.1 Manipulação animal	137
1.2 Cateterização cardíaca, avaliação hemodinâmica e angiográfica	138
1.3 Avaliação electrocardiográfica	138
1.4 Avaliação do índice da resistência da microcirculação e da reserva de fluxo coronário	139
1.5 Disfunção da microcirculação coronária	141
1.6 Diagrama	142
1.7 Análise estatística	142
<b>2. Segunda Fase</b>	<b>143</b>
2.1 Manipulação animal	143
2.2 Preparação das células estaminais mesenquimais	144
2.3 Cateterização cardíaca, avaliação hemodinâmica e angiográfica	147
2.4 Entrega intracoronária das células estaminais mesenquimais	147
2.5 Avaliação electrocardiográfica	148
2.6 Avaliação da pressão fluxo intracoronário	148
2.7 Diagrama	149
2.8 Análise estatística	150
<b>3. Terceira Fase</b>	<b>150</b>
3.1 Manipulação animal	150
3.2 Preparação das células mesenquimais	152
3.3 Cateterização cardíaca, avaliação hemodinâmica e angiográfica	153
3.4 Entrega intracoronária das células estaminais mesenquimais	153
3.5 Avaliação eletrocardiográfica	154
3.6 Avaliação da pressão e fluxo intracoronário	154
3.7 Avaliação anatomopatológica	154
3.8 Diagrama	157
3.9 Análise estatística	158
<b>VI. RESULTADOS</b>	<b>161</b>
<b>1. Primeira Fase</b>	<b>161</b>
<b>2. Segunda Fase</b>	<b>165</b>
<b>3. Terceira Fase</b>	<b>169</b>
3.1 Antes e após a indução do EAM	170
3.2 Caracterização das células estaminais mesenquimais	171
3.3 Grupo controlo vs. grupo de receptores de células	175
3.4 Três grupos (Controlo, Convencionais e Inovadoras)	178
3.5 Avaliação intragrupo	183
3.6 Avaliação anatomopatológica	184
<b>VII. DISCUSSÃO</b>	<b>191</b>



<b>1. Primeira Fase</b>	<b>191</b>
<b>2. Segunda Fase</b>	<b>195</b>
<b>3. Terceira Fase</b>	<b>198</b>
<b>VIII. LIMITAÇÕES DO ESTUDO</b>	<b>211</b>
<b>IX. CONCLUSÕES</b>	<b>217</b>
<b>X. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>221</b>
<b>XI. ANEXOS</b>	<b>261</b>
<b>XII. AGRADECIMENTOS</b>	<b>293</b>



# Introdução

---



### **I. INTRODUÇÃO**

Nas últimas décadas assistiu-se a um enorme desenvolvimento da Biotecnologia, o que possibilitou uma explosão da produção científica e um crescimento marcado do empreendedorismo com ela relacionado. A comunidade médica e a sociedade em geral têm recebido estes progressos como fonte de esperança para uma nova era da medicina moderna - a era da Terapia Celular e da Medicina Regenerativa.

A perda de células e de tecidos funcionais, devido a uma agressão aguda ou a um processo degenerativo, faz parte da fisiopatologia de várias doenças, que atingem a Humanidade com gravidade e prevalência suficientes para terem um impacto marcado na qualidade e expectativa de vida da população. A descoberta das células estaminais, com capacidade de se dividir e diferenciar em vários tipos celulares que constituem os tecidos e órgãos, foi desde cedo acompanhada pelo desejo de utilizar este seu potencial na prática clínica. A substituição de células e tecidos perdidos ou a utilização de propriedades terapêuticas das células, mesmo na ausência de regeneração, podem colmatar importantes insuficiências das terapêuticas atuais.

A Cardiologia foi das primeiras especialidades médicas a manifestar o seu interesse pela aplicação da Terapia Celular no tratamento das doenças cardíacas. O coração é um órgão com uma função essencialmente mecânica – a de bomba propulsora do sangue – dependendo sobretudo da ação contráctil do miocárdio. Vários processos patológicos culminam numa irreversível perda de miocárdio funcionante, na síndrome de insuficiência cardíaca e na diminuição da sobrevida. O exemplo mais paradigmático é dado pelo enfarte agudo do miocárdio (EAM), o qual resulta numa perda de milhões de cardiomiócitos por necrose isquémica, sendo que, a sua substituição por novas células contrácteis permitiria preservar a função cardíaca e modificar drasticamente o prognóstico de muitos doentes.

Contudo, são inúmeras as dificuldades disfarçadas nesta exemplificação simplificada do potencial da Terapia Celular e das células estaminais.

Portugal tem pela primeira vez na sua história uma verdadeira comunidade científica, com conhecimento e capacidade técnica para produzir ciência de qualidade e promover o desenvolvimento sustentado do país. Esta afirmação pode ser facilmente rotulada de lugar-comum face às circunstâncias atuais, mas são estas mesmas circunstâncias que a tornam mais relevante. A aplicação médica dos desenvolvimentos da Biotecnologia é objeto do interesse de muita da investigação nesta área, estando muitos cientistas portugueses posicionados para dela fazerem parte de forma expressiva.

Não é uma tarefa fácil a tradução do conhecimento que se acumula da genética, da biologia celular e molecular, da engenharia de células e tecidos ou da nanotecnologia, em novos tratamentos seguros, eficazes e viáveis. A magnitude e complexidade deste desafio transbordam os limites de qualquer área científica e obriga a utilização de uma abordagem multidisciplinar e transversal, com os vários intervenientes em harmonia quanto às suas capacidades, dificuldades e responsabilidades.

O contributo dos médicos neste esforço é essencial, sobretudo se a ambição for a presença de forma contínua nas várias etapas da investigação: básica, pré-clínica e clínica. Uma das pretensões deste trabalho foi o de dar um pequeno contributo para este processo, promovendo a formação de uma verdadeira equipa multidisciplinar, construído uma linguagem comum entre os seus membros e criando um caminho a percorrer em conjunto, que só agora se iniciou.

A implementação de um modelo animal de grande porte, onde fosse possível utilizar as técnicas da Cardiologia de Intervenção e os meios de avaliação de variáveis biológicas com tradução mais próxima da clínica, foi também tido como um propósito importante deste trabalho. A investigação pré-clínica com modelos adequados e mais próximos do ser humano, é essencial para uma correta e mais segura evolução da investigação clínica, devendo fazer parte

dos recursos disponíveis no nosso país.

Assumimos que o trabalho do qual resulta esta tese foi um primeiro passo, que se quis firme e equilibrado, para alcançar objetivos comuns iniciais e levar a investigação com células estaminais em Portugal um pouco mais à frente. Procurámos uma questão em aberto, com relevância clínica e cuja resposta pudesse acrescentar algo de novo à investigação nesta área. Também foi condição que o objeto de estudo permitisse uma sinergia dos recursos existentes, científicos e técnicos, e que fosse a continuação da experiência já existente dos diferentes grupos.

As células estaminais mesenquimais (CEM) têm características próprias (imunológicas, metabólicas e de transdiferenciação) que as tornam particularmente interessantes para a aplicação clínica e que motivaram o entusiasmo de muitos investigadores. O Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia do Instituto superior Técnico tem trabalhado há vários anos no estudo e desenvolvimento dos processos de caracterização, cultura e expansão das CEM. Esteve também ligado à experiência pioneira em Portugal da utilização clínica destas células, quando colaboraram com o Instituto Português de Oncologia no tratamento da doença do enxerto contra o hospedeiro, após o transplante de medula óssea. Desta forma, a escolha das CEM como um dos objetos do presente estudo foi natural e consentânea com o interesse prévio por estas células.

A Cardiologia de Intervenção tem tido um papel importante no desenvolvimento da investigação clínica em Terapia Celular. A ligação íntima à doença coronária, destacando-se o já referido EAM, explicam uma parte do interesse manifestando e que se concretizou em dezenas de ensaios clínicos já realizados. Não menos importante porém, a Cardiologia de Intervenção foi chamada nos últimos anos a utilizar as suas técnicas endovasculares para a entrega das células ao coração, de forma eficaz e menos invasiva. Dos métodos de entrega das células, a via intracoronária ganhou particular relevância por combinar a capacidade de injeção local de um grande número de células, com o conhecimento e a capacidade já instalada das técnicas de

intervenção intracoronária e que fazem atualmente parte da prática clínica diária.

A semelhança do que aconteceu em outros países, a investigação clínica com células estaminais em Cardiologia iniciou-se em Portugal em doentes com EAM com elevação do segmento ST. No estudo GENESIS realizado pelo nosso grupo, 40 doentes foram randomizados para receberem transplante autólogo de células mononucleadas da medula óssea (CMNMO), feito por via intracoronária, ou para o tratamento otimizado convencional. O principal objetivo foi a avaliação da segurança e exequibilidade desta estratégia, já em utilização por vários grupos estrangeiros, e secundariamente pretendeu-se procurar evidência de efeitos positivos nas dimensões de enfarte e na função sistólica regional e global do ventrículo esquerdo, avaliados por ressonância magnética cardíaca (RMC). Os seus resultados serão incluídos na descrição da experiência atual nesta área.

Sendo a via intracoronária aparentemente a mais interessante para ser utilizada no contexto de EAM, e a que decorre da experiência já existente, a verdade é que a sua utilização para a entrega das CEM tem sido rodeada de receios e controvérsia. Estas células têm dimensões relativamente grandes, sendo o seu diâmetro superior aos dos capilares coronários, o que motiva apreensão quanto à possibilidade de obstrução da microcirculação pelo risco de compromisso da circulação coronária.

Evoluções tecnológicas recentes permitem atualmente o estudo invasivo e em tempo real da microcirculação coronária. Através da utilização de fios-guia intracoronários específicos, que permitem avaliar em simultâneo a pressão e o fluxo coronário, é possível avaliar de forma quantitativa o estado da microcirculação. Sendo uma técnica em fase de implementação, o seu potencial ainda está em estudo em várias vertentes da investigação clínica.

A aplicação do estudo invasivo da microcirculação cardíaca à avaliação dos efeitos da injeção intracoronária de células mesenquimais tornou-se o tema central da investigação que alicerça esta tese. A utilização de um modelo



animal de grande porte foi condição essencial para a sua concretização. A escolha recaiu sobre o porco, sendo este o modelo ideal pela semelhança da sua circulação cardíaca com a do ser humano. Logo de início, compreendeu-se que teria de existir uma primeira fase de validação do estudo da microcirculação neste modelo e com esta técnica reconhecidamente complexa e ainda recente. Apostou-se em valorizar esta etapa estudando também aspetos inerentes à técnica de avaliação da microcirculação que ainda não se encontravam descritos. Mas mais importante, o apuramento dos procedimentos técnicos necessários permitiu a conclusão da segunda e terceira fases experimentais de forma fiável e válida.

No capítulo seguinte serão desenvolvidos os vários conceitos expostos nesta introdução.



# Fundamentos

---



## **II. FUNDAMENTOS**

---

### **1. Terapia Celular Em Cardiologia – O Estado Da Arte**

A aplicação clínica do potencial terapêutico das células estaminais encontra-se ainda no âmbito da investigação. A Terapia Celular não faz atualmente parte das normas de tratamento de nenhuma doença cardiovascular. Ainda existe um caminho a percorrer, sendo a sua extensão ainda incerta. A motivação e o investimento nesta área têm crescido continuamente mas, paradoxalmente, encontramos hoje com muito mais questões em aberto e com mais encruzilhadas do que há uma década atrás, quando começaram os primeiros estudos clínicos.

Neste capítulo procurar-se-á expor as razões que despertam o interesse de tantos investigadores, descrever o conhecimento atual sobre células estaminais no que é mais pertinente para a sua aplicação médica e resumir avanços já realizados na investigação clínica. O nosso contributo com este trabalho ficará desta forma contextualizado.

#### **1.1 Doenças Cardíacas E O Potencial Da Terapia Celular**

##### **1.1.1 O impacto da doença cardiovascular**

Durante o século XX as doenças cardiovasculares tornaram-se a principal causa de morte e uma importante causa de incapacidade, de perda de produtividade e de crescimento dos custos com a saúde em todo o mundo <sup>1</sup>. Na origem desta evolução está a profunda modificação dos hábitos e estilos de vida a que se assistiu nos países industrializados, e que continua a

decorrer atualmente nos países em desenvolvimento.

A influência de outrora das doenças cardiovasculares nas políticas de saúde, na captação de recursos, na comunicação social e na própria consciencialização das populações é hoje provavelmente menor, fruto da legítima partilha desse espaço com outras patologias que ganharam entretanto relevância. É no entanto importante ter presente alguns dados epidemiológicos atuais, para não haver o risco de um incorreto posicionamento das doenças cardiovasculares pelos vários atores que lideram os destinos das populações.

Nos Estados Unidos da América a mortalidade cardiovascular foi responsável por 32.3% de todas as mortes em 2009 <sup>2</sup>. Também nos últimos anos, as doenças cardiovasculares foram a causa de 47% das mortes na Europa e de 40% das registadas no espaço da União Europeia <sup>3</sup>. Está estimado que se fosse possível eliminar todas as principais patologias cardiovasculares, a esperança média de vida da população aumentava em cerca de 7 anos, contra apenas 3 se todas as formas de doença oncológica fossem prevenidas <sup>2</sup>. Da mesma forma, a probabilidade à nascença de morrer vítima de um evento cardiovascular é de 47% e a probabilidade de morrer de cancro é menos de metade, 22% <sup>2</sup>. Dados de 2003 mostram que as doenças cardiovasculares são responsáveis pelos maiores custos ligados à saúde e perda de produtividade nos Estados Unidos da América, estimando-se que excedam os 400 000 milhões de dólares <sup>4</sup>. Na União Europeia, e no mesmo ano, esse valor foi estimado em 169 000 milhões, com 62% do total gasto nos cuidados de saúde, 21% decorrentes da perda de produtividade e 17% de cuidados informais <sup>5</sup>.

As estratégias terapêuticas atuais permitem a sobrevivência de muitos doentes, que certamente morreriam há 3 décadas atrás. Porém, numa significativa proporção destes doentes não é possível recuperar a sua função cardíaca e a sua capacidade funcional, de forma a retomarem a sua atividade diária habitual. Quase um quarto dos anos de vida ajustados pela qualidade

(AVAQ) perdidos em 2002 na Europa tiveram como responsável um evento cardiovascular <sup>6</sup>. A doença cardíaca isquêmica é presentemente a principal causa de perda AVAQ em todo o mundo, tendo-se registado um aumento de 29% nas últimas duas décadas, apesar dos grandes progressos na sua prevenção e tratamento <sup>7</sup>.

O envelhecimento da população e o aumento esperado da prevalência da Diabetes Mellitus e da obesidade, não serão provavelmente compensados pelos sucessos no controlo da hipertensão arterial e da dislipidemia, nem pelos avanços na luta antitabágica, sendo previsível um aumento da prevalência das doenças cardiovasculares nas próximas décadas. O já referido sucesso dos tratamentos atuais contribui também de forma importante para crescimento da população com doença cardiovascular, ao prolongar a vida de muitos doentes. A American Heart Association estima este aumento da prevalência nos Estados Unidos da América em 10% durante os próximos 20 anos (sendo 25% se considerarmos apenas a insuficiência cardíaca) e os custos diretos associados às doenças cardiovasculares crescerão para o triplo durante o mesmo período <sup>8</sup>. Poder-se-á concluir que o sucesso na descida da mortalidade das doenças cardiovasculares não tem sido acompanhado pela diminuição da sua morbilidade, sendo um exemplo a manutenção do elevado número de readmissões hospitalares por insuficiência cardíaca registadas nos últimos anos <sup>9</sup>.

Nos países em desenvolvimento assiste-se a uma transição epidemiológica, com o aumento da prevalência dos fatores de risco cardiovascular a motivar a subida da mortalidade cardiovascular para o topo das principais causas de morte, ficando de forma clara à frente das doenças associadas ao vírus de imunodeficiência humana, da malária e da tuberculose, mesmo se combinados <sup>1</sup>. Antecipa-se para 2020 um crescimento da prevalência da doença coronária de aproximadamente 130% nestes países, sendo que para muitos este problema é agravado pela falta de recursos humanos e financeiros para o enfrentar <sup>10</sup>.

Portugal acompanha os outros países ocidentais na descida da mortalidade cardiovascular que se verificou nas últimas duas décadas. Apesar da subida da mortalidade oncológica, as doenças cardiovasculares continuam a ser a principal causa de morte no nosso país, com uma mortalidade ajustada à idade, ou padronizada, estimada em 390 / 100 000 habitantes em 2013 <sup>11</sup>. Caracteristicamente no nosso país, a principal parte é da responsabilidade das doenças cerebrovasculares, com uma mortalidade padronizada de 61.9 / 100 000 habitantes, claramente superior aos 34.9 / 100 000 verificada com a doença cardíaca isquémica <sup>11</sup>. Esta inversão é contrária ao que acontece na maioria dos países europeus, estando Portugal apenas acompanhado pela Grécia e a Bulgária. Os custos diretos das doenças cardiovasculares em Portugal no ano 2000, relacionados com hospitalização, consultas e exames complementares, foram avaliados em 176 milhões de euros, cabendo a maior parte à doença cardíaca isquémica <sup>12</sup>. Em 2010 os anos potenciais de vida perdidos para as doenças cardiovasculares foram calculados em 42 411 <sup>11</sup>.

De uma forma geral, os números apresentados espelham bem a magnitude do problema constituído pelas doenças do foro circulatório, cujo impacto merece atenção e justifica a procura de novas e melhores soluções.

### **1.1.2 Doenças cardíacas e as limitações das terapêuticas atuais**

As doenças cardíacas são alvo de uma parte considerável da investigação realizada com células estaminais, o que é explicado não só pelo seu marcado impacto na saúde das populações, mas também pela relação direta entre a quantidade de músculo cardíaco funcional, presente no coração, e as suas manifestações clínicas e prognóstico.

Os tratamentos hoje disponíveis nas várias formas de doença cardíaca, continuam a apresentar limitações, pois não conseguem restaurar o miocárdio e recuperar a função ventricular em muitos doentes.



### 1.1.2.1 Insuficiência cardíaca e remodelação ventricular

A insuficiência cardíaca é definida como a incapacidade do coração entregar sangue oxigenado de forma adequada às necessidades metabólicas dos tecidos, ou apenas fazê-lo às custas do aumento das pressões de enchimento ventricular, sendo esta incapacidade o resultado de alterações da estrutura ou função cardíaca <sup>13</sup>. A insuficiência cardíaca é também uma síndrome que engloba as manifestações de baixo débito cardíaco e de congestão vascular, sendo o resultado comum de vários processos patológicos que envolvem o coração.

Com a progressão da doença cardíaca existem alterações dos componentes genéticos, moleculares, celulares e intersticiais do coração, bem como alterações dos mediadores homeostáticos do organismo. A manifestação visível destas alterações é uma alteração no tamanho, na forma e na função ventricular, conhecidas como remodelação ventricular <sup>14</sup>. Estas alterações ventriculares traduzem um processo contínuo de deterioração cardíaca que ocorre mesmo na ausência da agressão inicial. A remodelação ventricular constitui um alvo terapêutico por si, pois a sua prevenção, minimização ou regressão, resultará numa melhoria do estado clínico dos doentes e num melhor prognóstico.

Os mecanismos da remodelação ventricular não estão ainda completamente elucidados, mas acredita-se que os cardiomiócitos têm um envolvimento importante neste processo <sup>14</sup>. Após a perda de um número significativo destas células, como resultado de uma agressão miocárdica, a sobrecarga imposta aos cardiomiócitos sobreviventes leva a alterações genéticas que se traduzem na hipertrofia ou alongamento destas células. Isto ocorre como forma de aumentar a sua ação contráctil, para compensar a perda de miocárdio e manter o volume sistólico do ventrículo esquerdo. Este mecanismo de compensação é no entanto insuficiente e a sobrecarga

hemodinâmica mantêm-se, promovendo um ciclo vicioso de aumento da hipertrofia celular, da tensão da parede ventricular, das necessidades metabólicas e da potenciação da isquemia celular. A perda contínua de células através de mecanismos de apoptose e a alteração da matriz extracelular, com a degradação do seu componente colagénico, também têm sido apontados como influentes no processo de remodelação ventricular <sup>15,16</sup>.

A ativação de mediadores neurohormonais, resultante da diminuição do débito cardíaco e da congestão vascular, tem um papel importante neste ciclo vicioso, contribuindo para a progressão da remodelação ventricular e para deterioração clínica dos doentes. Os mais conhecidos fazem parte do sistema nervoso simpático e do eixo renina-angiotensina-aldosterona <sup>17</sup>. A terapêutica atual da insuficiência cardíaca baseia-se sobretudo em fármacos que inibem estes mediadores neurohormonais <sup>18</sup>. Os inibidores do enzima de conversão da angiotensina (IECA), os antagonistas dos recetores da aldosterona (ARA) e os antagonistas da aldosterona demonstraram em ensaios clínicos ter um efeito significativo na redução da morbilidade e mortalidade associada à insuficiência cardíaca e também, no caso dos IECA e ARA, nos doentes com disfunção ventricular sistólica assintomática <sup>19</sup>. O mesmo foi demonstrado para os inibidores dos recetores  $\beta$ -adrenérgicos <sup>20</sup>. Estas classes de fármacos influenciam favoravelmente a remodelação ventricular, observando-se inicialmente uma redução das dimensões dos ventrículos e um aumento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), ou pelo menos a sua estabilização, sendo esta provavelmente uma causa importante do seu benefício clínico <sup>21-24</sup>. No entanto, é reconhecido que na maioria dos doentes a progressão da insuficiência cardíaca não é interrompida pela terapêutica farmacológica, mas apenas atrasada.

Existem atualmente estratégias não farmacológicas que se associam frequentemente à terapêutica medicamentosa. Para diminuir o risco de morte súbita, causado pela ocorrência de disritmias ventriculares graves, os doentes com risco acrescido têm atualmente indicação para colocar um dispositivo mecânico com capacidade de reconhecer e terminar estas

disritmias com a administração de estímulos elétricos. Os cardioversores-desfibriladores implantados (CDI) demonstraram uma redução expressiva da mortalidade nesta população <sup>25,26</sup>. Contudo, estes dispositivos não têm efeito nos sintomas ou na remodelação cardíaca, prolongando a vida a doentes que podem manter um compromisso funcional significativo. Acresce ainda que os CDI motivam por si só uma morbilidade importante e não têm benefício na fase mais avançada da insuficiência cardíaca.

Um grupo seletivo de doentes sintomáticos, sem resposta adequada à terapêutica médica e com alargamento do intervalo QRS no eletrocardiograma, tem ainda como estratégia terapêutica a ressincronização cardíaca. Baseada na ação de um *pacemaker* biventricular, esta tem como objetivo coordenar a contração ventricular, minimizando os atrasos na condução inter e intraventricular e otimizando desta forma o trabalho cardíaco. Estes dispositivos também podem ter associada a função de CDI e prevenir as consequências de disritmias graves. Alguns ensaios clínicos demonstraram uma redução dos sintomas e das rehospitalizações, mas os resultados quanto à sobrevivência variaram entre o benefício e a ausência de um efeito significativo <sup>27-29</sup>. Tal como os inibidores neurohormonais, a terapêutica de ressincronização cardíaca provou ser capaz de induzir uma redução das dimensões de ventrículo esquerdo, com alteração da sua forma e melhoria da função sistólica <sup>30</sup>. Foi também demonstrada uma correlação entre a diminuição dos sintomas e o aumento da tolerância ao esforço com esta remodelação ventricular inversa <sup>31</sup>. Porém, estes benefícios só estão ao alcance dos doentes com critérios específicos para a implantação destes dispositivos, e mesmo nesta população cerca de 1/3 dos doentes são não respondedores, não mostrando melhoria sintomática ou alteração da geometria e função ventricular.

Para os doentes com insuficiência cardíaca terminal o transplante cardíaco tem sido uma alternativa terapêutica que prolonga a vida e leva a uma impressionante melhoria funcional, a qual permite frequentemente a retoma da atividade diária com poucas limitações. Estes doentes têm no entanto de

ter condições próprias e de suporte que lhes permita manter a adesão ao exigente programa de tratamento pós transplante. Além disso, as contraindicações são frequentes, o que limita a transplantação a um grupo muito selecionado de doentes. Por outro lado, as comorbilidades associadas à imunossupressão crónica têm um impacto negativo importante na qualidade de vidas dos doentes transplantados. A somar a tudo isto, a escassez de órgãos para doação limita a expansão da transplantação cardíaca, sendo claro que a solução futura para a insuficiência cardíaca dependerá de outras estratégias a desenvolver.

Com exceção da transplantação cardíaca, nenhuma das atuais modalidades terapêuticas têm um efeito direto no seu principal mecanismo desencadeante - a perda de tecido contráctil. Isto explica em parte que os seus benefícios não se observem em todos os doentes e que exista ainda uma elevada morbilidade e mortalidade residual nesta população. A verdade é que a mortalidade associada à insuficiência cardíaca continua elevada e, mais relevante, não se alterou nas últimas duas décadas apesar dos progressos já descritos<sup>32,33</sup>.

A Terapia Celular ajusta-se ao modelo biomecânico da insuficiência cardíaca, proposto para substituir o modelo fisiopatológico neuroendócrino. O modelo biomecânico prevê que as terapêuticas que melhorem a função sistólica, e revertam a remodelação ventricular, vão ter a capacidade de interromper a progressão dos mecanismos de insuficiência, o que as terapêuticas farmacológicas atuais não conseguem pois atuam apenas na ativação neurohormonal e não na sua causa<sup>34</sup>. Se com a Terapia Celular for possível a renovação do músculo cardíaco, com a introdução de novos cardiomiócitos saudáveis e capazes de recuperar a função contráctil do ventrículo esquerdo, abre-se a possibilidade de, segundo o modelo biomecânico, reverter-se de forma definitiva o processo de remodelação ventricular. Desta forma, com o sucesso da medicina regenerativa e a capacidade de restaurar o músculo cardíaco, os mecanismos viciosos da remodelação cardíaca seriam

abortados, transformando radicalmente a história natural da insuficiência cardíaca.

São três as entidades patológicas que constituem a principal causa de insuficiência cardíaca e que têm concentrado a atenção da investigação focada para a concretização de uma estratégia terapêutica baseada em células: o EAM, a cardiomiopatia isquêmica crônica e a cardiomiopatia dilatada não isquêmica.

### 1.1.2.2 Enfarte agudo do miocárdio

Na maioria dos doentes o EAM resulta da instabilização de uma placa arterosclerótica presente numa artéria coronária. O processo trombótico que se segue culmina no compromisso da perfusão do miocárdio a jusante, o que leva à morte celular por isquemia. Dois tipos de EAM são distinguidos pelas diferenças na sua fisiopatologia, apresentação clínica e tratamento. No EAM sem elevação do segmento ST (no traçado eletrocardiográfico) este processo trombótico não motiva uma oclusão completa do vaso relacionado com a lesão culpada, e é a embolização distal que compromete de forma não homogênea a pequena circulação, levando a uma necrose isquêmica difusa, sobretudo no território subendocárdico. Por outro lado, no EAM com elevação do segmento ST ocorre a oclusão completa e mantida da artéria coronária colocando em sofrimento isquêmico, e em risco de necrose, o músculo cardíaco irrigado por essa artéria, em toda a sua espessura – sendo por isso também designado por EAM transmural. É no tratamento deste último que a Terapia Celular tem despertado interesse e doravante será sobre o EAM com elevação de ST que será usada a designação de EAM nesta redação.

Após a interrupção da circulação coronária a perda do músculo cardíaco ocorre de forma progressiva e dependente do tempo de isquemia, e com uma distribuição espacial do endocárdio para o epicárdio – o fenómeno de necrose em onda descrito na década de 70 <sup>35</sup>. As alterações celulares

induzidas pela isquemia resultam da privação de oxigênio e de glicose necessários para o metabolismo e passam pela depleção de ATP, alteração do fluxo transmembranar de iões, desintegração da membrana celular, destruição das mitocôndrias e libertação de enzimas proteolíticas <sup>36</sup>. Este é um processo em cascata que culmina na morte celular, mas que não se inicia simultaneamente em todas as células, pelo que é possível minimizar a sua perda se a circulação coronária for retomada atempadamente. É neste conceito que se baseiam as terapêuticas de reperfusão miocárdica, que constituem a atual base do tratamento do EAM.

A terapêutica fibrinolítica surgiu na década de 80, após os primeiros ensaios clínicos terem demonstrando que a administração intravenosa de um conjunto de fármacos com capacidade de promover a fragmentação da fibrina, importante para a integridade estrutural do trombo, levava à sua desintegração e à consequente resolução da obstrução e retoma da circulação coronária. A sua utilização no tratamento dos doentes com EAM associou-se a uma redução da mortalidade total de 30 em 1000, nos doentes tratados nas primeiras 6 horas, descendo para 20 em 1000, nos tratados entre as 7 e as 12 horas, sendo o benefício incerto após este intervalo <sup>37</sup>. Com o desenvolvimento da Cardiologia de Intervenção surgiu uma alternativa mecânica à reperfusão farmacológica, obviando sobretudo os riscos hemorrágicos associados a esta. A intervenção coronária percutânea (ICP) permite identificar o vaso ocluído e restabelecer o fluxo coronário, com a aspiração ou fragmentação do trombo e dilatação da lesão, com ou sem colocação de stent. Quando comparadas as duas estratégias a ICP mostrou resultados superiores à fibrinólise, ao que acresce a sua aplicação mais abrangente, pois tem menos contraindicações que os fibrinolíticos <sup>38,39</sup>. Uma desvantagem da reperfusão mecânica é a necessidade de disponibilizar em tempo útil uma equipa com experiência e os meios necessários para a intervenção coronária.

A reperfusão marcou uma nova era no tratamento do EAM. Contudo, existem obstáculos que impedem muitos doentes de beneficiar desta estratégia,

mesmo após a implementação de uma rede de assistência pré-hospitalar e hospitalar de cuidados coronários na maioria dos países desenvolvidos. Uma importante limitação está relacionada com a estreita janela terapêutica para implementar com eficácia um tratamento de reperfusão. Tal como já referido, a necrose de miocárdio é progressiva e está dependente do tempo de isquémia, sendo que a sua extensão pode ser diminuída quanto menor for o tempo entre a oclusão da artéria e o restabelecimento do seu fluxo. A principal redução da mortalidade concentra-se quando a reperfusão é instituída nas primeiras 2 horas, sendo que após um limiar de cerca de 12 horas a maior parte da morte celular já ocorreu e o seu benefício provavelmente passa a ser diminuto ou inexistente, na ausência da manutenção de sintomas ou de evidência de sofrimento celular <sup>40-43</sup>. Dados do registo Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE) mostram que cerca de metade dos doentes reperfundidos não o é dentro dos limites estabelecidos, o que fornece uma boa noção da expressão desta limitação temporal no tratamento do EAM <sup>44</sup>.

As causas para o atraso na implementação de uma adequada estratégia de reperfusão dividem-se nas relacionadas com o doente, que influenciam o tempo entre o início dos sintomas e o primeiro contacto com o sistema de saúde, e nas relacionadas com o próprio sistema, responsável pelo diagnóstico correto e por providenciar os cuidados necessários ao tratamento adequado. O tempo relacionado com o doente ultrapassa as 2 horas na maioria dos casos e, mais preocupante, não se tem conseguido uma redução significativa apesar da implementação de várias estratégias de intervenção na comunidade <sup>45</sup>. O atraso dependente do sistema de saúde também estabilizou nos últimos anos, tendo uma grande variabilidade geográfica e sendo provavelmente reduzida a margem atual para uma melhoria significativa em muitos países <sup>44</sup>.

Apesar dos enormes progressos efetuados nos cuidados de saúde, pré-hospitalar e hospitalar, uma proporção importante dos doentes com EAM continua a não ser alvo de uma terapêutica de reperfusão - 23-30% segundo

alguns autores <sup>46,47</sup>. Infelizmente a insuficiência cardíaca pós EAM é ainda frequente, afetando cerca de 18% dos doentes, de acordo com registos de grande dimensão, apesar de vivermos na era da reperfusão há cerca de 3 décadas <sup>48,49</sup>.

Muitos doentes terão a sua qualidade e expectativa de vida comprometidas após sobreviverem a um EAM, pois não se evitou uma perda significativa de músculo cardíaco. Na sequência de uma perda superior a 15 % da massa muscular do ventrículo esquerdo começa a ser evidente um compromisso da função sistólica, observando-se uma descida de 6 % da FEVE por cada 5% de miocárdio perdido <sup>50</sup>. Por outro lado, uma perda superior a cerca de 25% do miocárdio associa-se a uma mortalidade de 40% aos 3 anos, sendo que esta relação com uma menor sobrevida começa a ser observada após uma perda de cerca de 12% <sup>51,52</sup>.

O processo endógeno de reparação cardíaca após um enfarte do miocárdio é infelizmente limitado. No primeiro dia ocorre a necrose celular do território lesado e o início da degradação do colagénio da matriz extracelular. Nos dias seguintes instala-se uma verdadeira resposta inflamatória com a ativação dos macrófagos residentes e infiltração de outras células inflamatórias, como os neutrófilos e os monócitos, e com a secreção de citocinas, fatores de crescimento e metaloproteinases <sup>53,54</sup>. Este processo culmina na remoção do tecido necrosado e na extensa deposição de colagénio pelos fibroblastos, originando uma cicatriz fibrótica, sendo que a percentagem desta massa cicatricial final está intimamente ligada ao prognóstico dos doentes com EAM <sup>55</sup>. A localização e dimensão do enfarte, a tensão na parede ventricular e o processo de reparação celular determinam se o coração progride ou não para as alterações morfofuncionais características da remodelação ventricular <sup>56</sup>.

As terapêuticas que permitam recuperar ou regenerar tecido miocárdico, afetando positivamente o processo de remodelação ventricular, vão ter com certeza um impacto importante e ser um novo marco no tratamento do EAM.



### 1.1.2.3 Doença isquémica crónica

A doença isquémica crónica inclui duas entidades patológicas com especial interesse para a Terapia Celular: a cardiomiopatia isquémica; e a angina de peito refratária à terapêutica convencional.

O termo cardiomiopatia isquémica descreve a existência de um compromisso significativo da função sistólica ventricular motivado pela presença de doença coronária <sup>57</sup>. Este compromisso da função contráctil resulta da perda de miocárdio, após um ou múltiplos enfartes, ou da presença de uma extensão considerável de miocárdio não funcionante por deficiente irrigação coronária, ou seja por isquémia, embora permaneça viável se supridas as suas necessidades metabólicas. De realçar que em muitos doentes estes dois mecanismos estão presentes e contribuem em simultâneo para a disfunção ventricular.

A cardiomiopatia isquémica é a principal causa de insuficiência cardíaca por disfunção sistólica na maioria dos países, representando mais de metade dos casos na Europa e América do Norte e um terço na Ásia e América do Sul <sup>58</sup>. O tratamento da cardiomiopatia isquémica partilha com todas as outras causas de insuficiência cardíaca das estratégias já referidas de inibição da ativação neuroendócrina e de utilização de dispositivos implantados. Além destas, na cardiomiopatia isquémica existe evidência do benefício da prevenção secundária, com o controlo adequado dos fatores de risco de doença coronária, a antiagregação plaquetária e a utilização de estatinas. Na presença de angina ou de evidência de miocárdio viável, a medicação antiisquémica e/ou a revascularização coronária são outras opções terapêuticas a considerar na doença isquémica <sup>18</sup>.

Cerca de 30 a 50% dos doentes com cardiomiopatia isquémica têm miocárdio viável em quantidade suficiente para ser expectável que, com a sua revascularização, ocorra uma melhoria da função ventricular, das queixas e do seu prognóstico <sup>59,60</sup>. Estão descritos um aumento da contractilidade e da

espessura do miocárdio nos segmentos isquêmicos, um aumento médio de 8% da FEVE e uma redução de 80% do risco anual de morte após a revascularização coronária <sup>61-63</sup>. A maioria desta evidência vem de estudos observacionais ou com populações pequenas, porém, num estudo recente de grande dimensão, com 1212 doentes randomizados para terapêutica médica ou para a sua associação com revascularização cirúrgica, não houve benefício desta última quanto há mortalidade total, embora tenha sido observada uma redução significativa da mortalidade cardiovascular e das hospitalizações <sup>64</sup>. Merecem atenção os resultados de uma análise posterior deste estudo, que mostraram uma concentração do benefício observado nas formas menos graves da doença, sendo que nos doentes com um compromisso mais marcado da função sistólica e maior dilatação do ventrículo esquerdo a revascularização cirúrgica teve mesmo um efeito negativo no seu prognóstico <sup>65</sup>.

Embora o papel da revascularização miocárdica seja um tema ainda em aberto, ela está preconizada nas orientações terapêuticas atuais, e o estudo da viabilidade miocárdica e da anatomia coronária, para considerar a possibilidade de uma estratégia de revascularização, continua a fazer parte da prática clínica diária. No entanto, a decisão sobre a revascularização mecânica é complexa e depende da existência de comorbilidades que aumentem o risco da intervenção, e da anatomia coronária, sendo que não é possível uma revascularização completa em cerca de 20% dos casos (incluindo 7% dos doentes sem possibilidade de qualquer revascularização), por doença coronária difusa, estenoses distais ou envolvimento de pequenos vasos <sup>66</sup>. Por outro lado, a FEVE não melhora com a revascularização coronária em um terço dos doentes com viabilidade miocárdica demonstrada <sup>67</sup>.

Em alguns doentes a principal manifestação da doença isquémica crónica é a angina de peito, a qual é definida como refratária no caso de causar um compromisso significativo da qualidade de vida e de estarem esgotadas as opções terapêuticas convencionais. A isquémia do miocárdio, e

consequentemente a angina ou um seu equivalente (dispneia ou intolerância ao esforço), resulta de um desequilíbrio entre as necessidades de oxigénio do músculo cardíaco e o seu fornecimento, sendo a sua principal causa a doença coronária.

O tratamento atual da angina assenta há quase 40 anos em fármacos com propriedades antianginosas ( $\beta$ -bloqueantes, antagonistas dos canais de cálcio ou nitratos) e na revascularização miocárdica, cirúrgica ou percutânea<sup>68-70</sup>. Apesar de muito eficaz, estima-se que esta estratégia terapêutica não é possível ou suficiente em cerca de 5 a 15 % dos doentes com angor estável, sendo ainda previsível um aumento da prevalência da angina refratária com a melhoria da sobrevida dos doentes coronários<sup>71</sup>. Também numa proporção importante dos casos existe mesmo falência da revascularização mecânica prévia, por progressão da doença, reestenose dos stents ou oclusão das pontagens coronárias<sup>72,73</sup>.

Apesar da maioria dos doentes ter a função ventricular sistólica preservada, a angina refratária tem um impacto marcado na sua qualidade de vida, ao condicionar a execução das suas tarefas diárias, assim como na redução da sua esperança de vida<sup>73</sup>. Nos últimos anos têm sido exploradas várias modalidades terapêuticas com a expectativa de constituírem uma alternativa para estes doentes. Novos fármacos como a ranolazina<sup>74</sup> e a ivabradina<sup>75</sup>, bem como novas estratégias mecânicas como a contrapulsção externa<sup>76</sup>, a estimulação elétrica da medula espinal<sup>77</sup> e a revascularização miocárdica por laser<sup>78</sup>, têm mostrando algum benefício, mas nenhum se implementou ainda como verdadeiro modificador da história natural da angina refratária.

A capacidade de promover a formação de novos capilares - angiogénese, ou de novos vasos arteriais - arteriogénese, nas regiões subperfundidas do coração, terá provavelmente a capacidade de reduzir a isquémia do miocárdio e levar a uma melhoria clínica expressiva<sup>79</sup>. A utilização de fatores de crescimento, a Terapia Genética e a Terapia Celular têm sido exploradas com esse objetivo<sup>80</sup>.

### 1.1.2.4 Cardiomiopatia dilatada não isquêmica

Uma grande variedade de perturbações genéticas ou adquiridas, como agressões virais e/ou imunológicas, podem ser causa de dilatação e disfunção ventricular na ausência de doença coronária significativa. A cardiomiopatia dilatada (CMD) inclui um conjunto diverso de condições patológicas e em metade dos casos não é possível definir uma etiologia específica, sendo então referida de idiopática <sup>81</sup>. A CMD constitui cerca de 25% dos casos de insuficiência cardíaca e é o principal motivo de referenciação para transplante cardíaco <sup>82,83</sup>. O prognóstico dos doentes sintomáticos com CMD continua a ser limitado, com uma mortalidade de 25% a 1 ano e de 50% a 5 anos, apesar dos avanços terapêuticos dos últimos anos <sup>84</sup>.

Dificuldades particulares no tratamento da CMD são a ausência da isquemia como alvo terapêutico e a natureza heterogênea desta população. As bases moleculares e os mecanismos fisiopatológicos da CMD ainda estão longe de estarem definidos ou compreendidos. No entanto, a perda de cardiomiócitos ou a sua disfunção generalizada são um fator central às alterações cardíacas da CMD. A perda de 10 a 20 % dos cardiomiócitos de forma dispersa é o suficiente para a falência cardíaca, um limiar inferior ao observado na perda concertada que ocorre no EAM <sup>85</sup>. Existe assim plausibilidade biológica de que a repopulação do coração com células saudáveis poderá contribuir para restaurar a função cardíaca.

Acredita-se também que em muitos doentes existe um desequilíbrio entre reações imunológicas humorais e celulares, o qual está na génese de uma agressão miocárdica continuada <sup>86</sup>. Desta forma, a ação terapêutica das células transplantadas poderá resultar das suas propriedades imunomoduladoras e de uma eventual influência nestes mecanismos

### 1.2 Requisitos para o sucesso da terapia celular cardíaca

A possibilidade de no futuro regenerar o músculo cardíaco e de restaurar a sua função para níveis normais é a grande promessa que a ciência ligada às células estaminais trouxe, pois nenhuma das terapêuticas atuais o consegue fazer. Este é o objetivo final, para o qual concorrem as múltiplas linhas de investigação neste campo, mas que só será alcançado com soluções que atendam às características específicas do tecido cardíaco.

O miocárdio é composto por células contráteis específicas – os cardiomiócitos – que estão intercalados num ciclo constante de contração e relaxamento, sendo eles a unidade funcional responsável pela contractilidade cardíaca. Os cardiomiócitos constituem cerca de 75% do volume do miocárdio, embora sejam apenas 30% das células que o constituem, sendo as outras: fibroblastos, células endoteliais, células musculares lisas, células vasculares e células em trânsito, como linfócitos, mastócitos e macrófagos<sup>87,88</sup>. Sustentados por uma matriz extracelular de colagénio, os cardiomiócitos dispõem-se em fibras musculares, partilhando entre si a sua massa citoplasmática através dos discos intercalados e formando um sincício funcional, necessário à sincronização eletromecânica da sua atividade<sup>88</sup>. Ao nível subcelular existem também mecanismos de sinalização complexos, que permitem responder às mensagens vindas dos recetores da membrana celular e, desta forma, coordenar a atividade cardíaca com as necessidades metabólicas do organismo.

A estrutura tridimensional do miocárdio é igualmente complexa e é parte importante da função cardíaca. As fibras musculares organizam-se em feixes musculares que estão dispostos por camadas com orientação circunferencial, oblíqua e em espiral helicoidal<sup>89</sup>. Esta arquitetura assimétrica potencia a atividade contráctil dos cardiomiócitos, verificando-se um aumento da espessura da parede ventricular de 50% com apenas um aumento de 13% do

espessamento das fibras musculares durante a sístole <sup>90</sup>. Devido a esta complexa disposição dos feixes musculares, existem múltiplos movimentos da parede ventricular durante a contração cardíaca. Além do aumento de espessura, observam-se também o encurtamento longitudinal e movimentos de rotação e torção, que no seu conjunto otimizam o trabalho cardíaco. Exemplificando, um encurtamento das fibras musculares de 15% traduz-se numa FEVE de 60%, mas no caso da arquitetura do coração ser simplesmente esférica a FEVE gerada pelo mesmo encurtamento seria apenas metade <sup>91</sup>. Estes movimentos, sobretudo os de torção, são também importantes para equalizar a tensão ao longo da parede ventricular <sup>89</sup>.

Os cardiomiócitos são células ricas em mitocôndrias (cerca de 1/4 da sua composição), de forma a fazer face às suas elevadas necessidades energéticas, que dependem quase exclusivamente da oxidação aeróbica da glicose <sup>88</sup>. Sendo o coração um órgão aeróbico, o seu sistema vascular está desenvolvido para dar resposta às suas necessidades de oxigenação. A rede arterial coronária é densa e termina nos capilares, com uma relação de quase um por célula e fornecendo cerca de 1 ml de sangue por grama de tecido <sup>92</sup>. Esta anatomia vascular é auxiliada por características fisiológicas próprias que permitem quadruplicar a perfusão cardíaca como resposta ao aumento das necessidades metabólicas – a chamada reserva de fluxo coronário <sup>93</sup>.

A tradução dos ciclos de contração e relaxamento dos cardiomiócitos numa atividade mecânica cardíaca eficaz tem como condição a correta coordenação destas células. A existência de canais iónicos na sua parede celular permite regular o influxo de catiões e a alteração do potencial elétrico da membrana, culminando na chamada despolarização. É esta despolarização que leva à libertação do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, sendo este o desencadeante molecular do processo de contração celular. A despolarização iniciada no nódulo sinusal é propagada pelo tecido condutor e, ao nível celular, pelas trocas iónicas que ocorrem nas *gap junctions*, situadas ao nível dos discos intercalados que unem os cardiomiócitos adjacentes.

A função cardíaca depende assim desta atividade eletromecânica sincronizada e esta necessidade tem consequências importantes. Na sua ausência a atividade contrátil cardíaca fica comprometida, o que no seu extremo se traduz na ausência de contração ventricular. Por outro lado, a existência de células sem integração eletromecânica, mesmo que em pequeno número, pode comprometer a sincronia de todo o coração, com a despolarização celular a ocorrer de forma errática e desorganizada, traduzindo-se na chamada fibrilhação ventricular e culminando na morte, se não revertida atempadamente.

O sucesso último da Terapia Celular cardíaca será alcançado quando for possível providenciar ao coração novos cardiomiócitos, em número suficiente, suportados por uma normal matriz de colagénio e por uma rede vascular adequada às suas necessidades metabólicas, respeitando a arquitetura tridimensional do miocárdio e estando integrados entre si e com as outras células residentes, não colocado em causa a estabilidade elétrica.

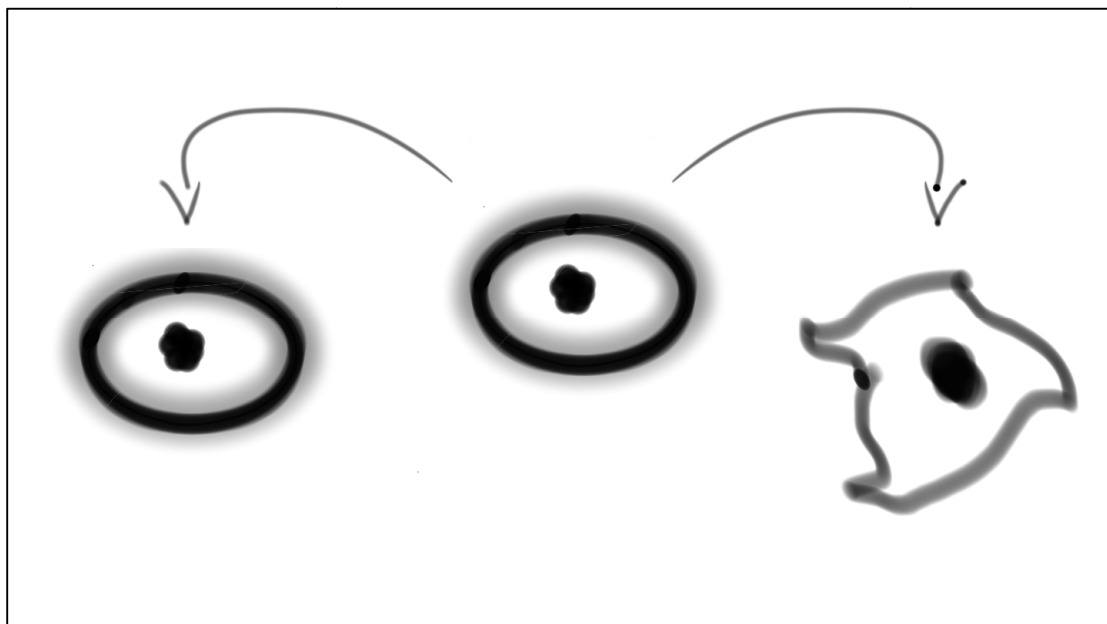
### **1.3 Células Estaminais E Medicina Regenerativa**

A apreensão plena do conhecimento relacionado com a medicina regenerativa é cada vez mais difícil devido à enorme expansão verificada nos últimos anos, tornando este campo vasto e com múltiplos intervenientes multidisciplinares, explorando uma ramificação cada vez maior de linhas de investigação. É no entanto possível ter presente alguns conceitos e noções gerais, necessários à compreensão do estado atual da investigação relacionada com a medicina regenerativa e a utilização de células estaminais.

#### **1.3.1 Considerações gerais**

A célula estaminal é definida por no seu processo de divisão ser simultaneamente capaz de se autorenovar e de se diferenciar em outra célula com características distintas (Figura 1) <sup>94</sup>. O termo data de 1861, quando o

biólogo e médico Ernst Haeckel o usa com dois sentidos, um ontogenético para descrever o óvulo fertilizado que origina um organismo e outro filogenético, como antecessor unicelular de todos os organismos multicelulares <sup>95</sup>. Nas décadas seguintes os investigadores ligados à embriologia e ao estudo da hematopoiese foram incorporando o termo estaminal, chegando aos nossos dias completamente integrado no conhecimento atual das ciências da vida <sup>96</sup>.



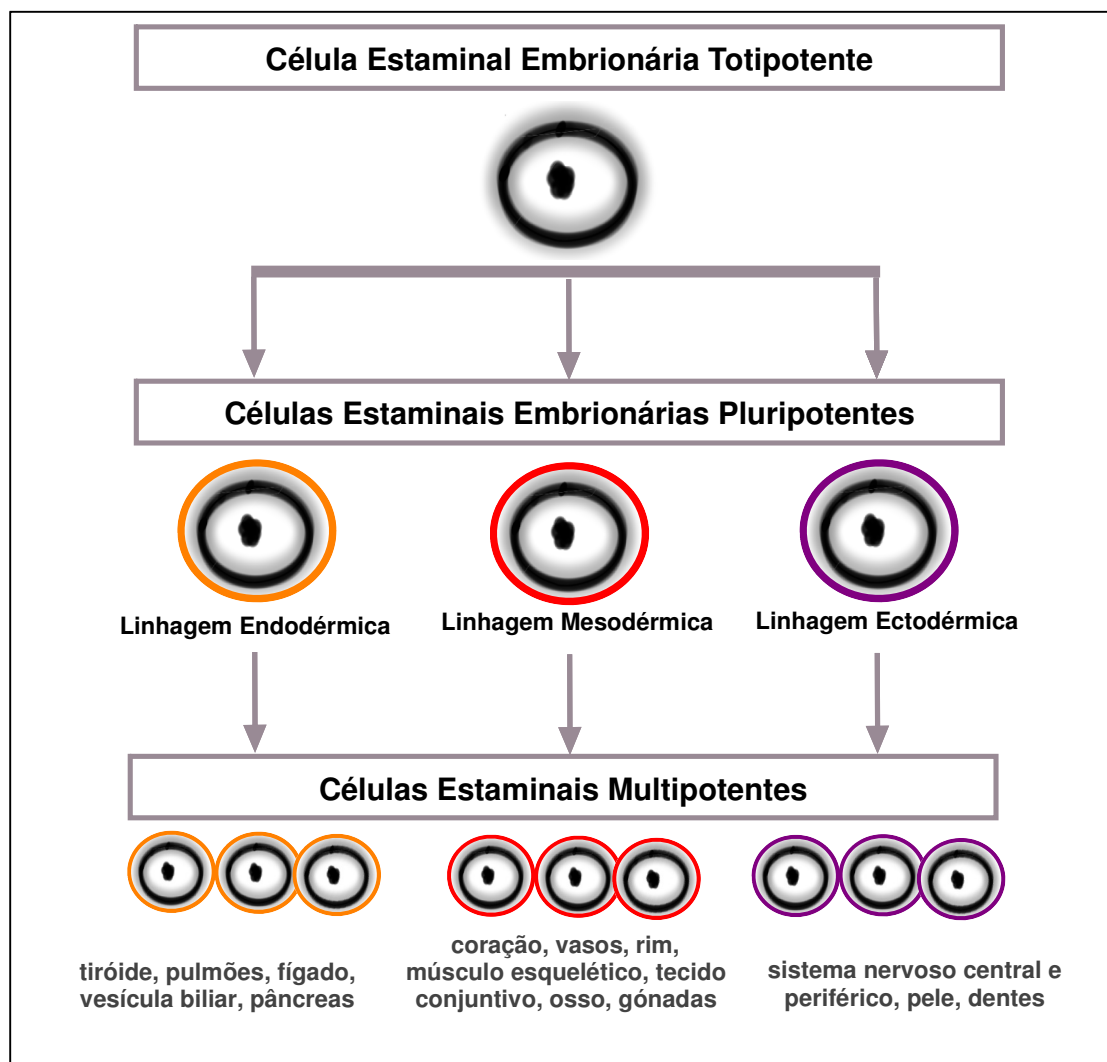
**Figura 1 – A célula estaminal.** No seu processo de divisão tem a capacidade de originar outra célula igual e de se diferenciar em outra com características distintas.

As células estaminais são classificadas e divididas segundo vários critérios <sup>97</sup>. De acordo com a sua origem são agrupadas em embrionárias e em somáticas (também designadas de adultas e incluindo nestas as células fetais e do cordão umbilical). Também podem ser divididas pela sua capacidade de diferenciação (Figura 2), sendo designadas por:

- a) totipotentes, com potencial de dar origem ao embrião e aos tecidos extraembrionários, necessários ao desenvolvimento completo de um novo organismo;
- b) pluripotentes, se capazes de originar células relacionadas com as três linhas germinais (ectoderme, mesoderme e endoderme);
- c) multipotentes, se apenas habilitadas a dar origem a um número limitado de tipos celulares;



d) unipotentes, comprometidas apenas com um tipo celular.



**Figura 2 - Hierarquia das células estaminais quanto à sua capacidade de diferenciação.**

Desde a constituição da mórula, contendo as únicas células totipotentes, passando pela formação do blastocisto, com as células pluripotentes da sua massa celular interna, até à formação dos tecidos e órgãos, assiste-se a uma diminuição gradual da capacidade de diferenciação das células estaminais.

Dois conceitos relacionados com as células estaminais e com influência na sua aplicação foram postos em causa nos últimos anos. Acreditava-se que as células estaminais somáticas estariam comprometidas com uma determinada linha celular relacionada com um tecido específico, mas estudos recentes têm

apontado para uma plasticidade maior destas células <sup>98</sup>. Desta forma, é possível conceptualizar a possibilidade de obter células e tecido cardíaco de células estaminais com origem extracardíaca, como por exemplo da medula óssea, onde o seu número é maior e a sua colheita mais fácil e segura. Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* parecem confirmar essa hipótese <sup>99,100</sup>, embora esta capacidade de transdiferenciação e o seu valor clínico esteja ainda envolto em controvérsia <sup>101,102</sup>. Esta transdiferenciação celular aparenta depender de desencadeantes moleculares locais ou sistémicos e de relações intercelulares, que ocorrem em caso de agressão tecidular e ainda não estão definidas.

Era também aceite de forma generalizada que alguns órgãos, incluindo o coração, não tinham qualquer capacidade regenerativa e estavam completamente diferenciados, mas novo conhecimento adquirido sobre a homeostasia celular cardíaca é incompatível com este conceito do coração como um órgão pós-mitótico <sup>103</sup>. O coração humano perde diariamente cardiomiócitos, o que na ausência da sua renovação significaria uma total depleção celular passados poucos anos. Foram posteriormente descobertas células estaminais residentes no coração e que provavelmente desempenham um papel nesta capacidade de recuperação endógena <sup>104</sup>. A utilização destas células estaminais cardíacas (CEC) e a estimulação e/ou ampliação destes processos de reparação endógena, de forma a serem eficazes na presença de patologia cardíaca, são estratégias resultantes desta mudança de paradigma e que têm merecido a atenção de alguns investigadores <sup>105</sup>.

A transplantação celular pode ser autóloga, usando células do próprio organismo recetor, ou alogénica, se forem utilizadas células de outro indivíduo da mesma espécie. O transplante autólogo tem a vantagem de evitar os processos imunológicos que podem levar à rejeição das células, limitando a sua eficácia, ou a fenómenos de sensibilização, comprometendo a sua segurança. Como desvantagem da utilização autóloga destacam-se a necessidade de um processo invasivo de colheita das células e a

impossibilidade da serem usadas na fase aguda dos processos patológicos, caso seja preciso uma cultura para expansão do seu número, a qual pode demorar semanas. Por seu lado, o transplante alogénico permite uma utilização das células mais próxima da realidade atual, como produto *off-the-shelf* pronto a ser administrado. Outra vantagem do modo alogénico é a possibilidade de utilização de células jovens, saudáveis e com bom potencial proliferativo, uma clara mais valia sobretudo no tratamento de doenças genéticas ou dos doentes idosos, onde as células estaminais do próprio podem estar já comprometidas <sup>106</sup>.

Os vários tipos de células estaminais apresentam diferentes potencialidades e limitações para a sua aplicação clínica, sendo que merecem ser abordados de forma distinta.

### **1.3.2 Células estaminais embrionárias**

As células embrionárias são pluripotentes, o que significa que têm a capacidade de gerar todas as células necessárias à formação do tecido muscular cardíaco e da rede vascular que assegura a sua irrigação. Elas foram pela primeira vez obtidas a partir de embriões de ratos em 1981, e quase duas décadas depois em humanos <sup>107,108</sup>. As células embrionárias diferenciam-se em cardiomiócitos *in vitro*, com propriedades estruturais e funcionais semelhantes às células encontradas nos corações adultos <sup>109</sup>. Em estudos animais estas células mostraram a capacidade de diferenciarem-se em células cardíacas, que sobrevivem e se integram electromecanicamente com as células nativas, no contexto de lesão cardíaca aguda ou de cardiomiopatia crónica <sup>110–112</sup>. Todavia, a sua utilização em estudos clínicos tem sido impedida por receios quanto à sua segurança e por importantes questões legais, éticas e religiosas.

As células embrionárias são extraídas da massa celular interna do blastocisto, num processo em que o embrião é destruído. Sendo o limiar de início da vida

flutuante com as crenças religiosas e as convicções éticas de uma sociedade, a perda deste embrião é reprovada ou mesmo ilegal em vários países. Deve ser realçado que existem milhares de embriões que são o excedente resultante da prática atual da medicina reprodutiva, e que ou são destruídos, após uma gravidez bem-sucedida, ou são armazenados sem fim útil à vista. Há um debate em aberto em que a comunidade científica, as entidades reguladoras e a sociedade em geral, tentam equilibrar o potencial terapêutico destas células e a mais-valia económica, associada à propriedade intelectual e aos futuros produtos desenvolvidos, com o respeito pelas crenças e convicções morais de todos intervenientes <sup>113</sup>. O desenvolvimento da investigação com células embrionárias depende do resultado desta discussão.

As limitações práticas relacionadas com o uso clínico das células embrionárias, consistem no risco de formação de teratoma e na necessidade de imunossupressão para evitar a sua rejeição e a dos tecidos a que dão origem <sup>114</sup>. Vários investigadores têm trabalhado em técnicas de diferenciação e de modificação celular na esperança de ultrapassar estas dificuldades e de abrir caminho para a sua utilização clínica no futuro.

### **1.3.3 Células estaminais pluripotentes induzidas**

As células estaminais pluripotentes induzidas (CEPi) resultam da conversão para um estado embrionário de células diferenciadas, através de técnicas de biotecnologia celular que permitem uma reprogramação genética da célula e a sua alteração para um estado de pluripotência <sup>115</sup>. Inicialmente foram utilizados fibroblastos, onde foi feita a transferência genética de quatro fatores de transcrição envolvidos na manutenção da pluripotência das células embrionárias, sendo hoje possível efetuar este processo de indução em vários tipos celulares. Este é um processo demorado e de baixa eficácia, apenas se conseguindo 0.001% a 0.1% de células induzidas <sup>116</sup>. Por outro lado, como vetores do processo de transferência são utilizados retrovírus o que implica potenciais riscos. Contudo, o desenvolvimento tecnológico

associado às CEPi tem permitindo ultrapassar estas limitações, melhorando a eficácia da indução e utilizando vetores não virais para a reprogramação das células <sup>116</sup>.

Tal como as células embrionárias, as CEPi são capazes de se replicar indefinidamente e de se diferenciarem em qualquer tipo de célula adulta, mas as restrições éticas e a necessidade de imunossupressão são ultrapassadas. Estudos pré-clínicos demonstraram o seu potencial no tratamento do EAM, observando-se: regeneração do tecido enfartado; neovascularização e melhoria da contractilidade cardíaca <sup>117–120</sup>. Infelizmente, o risco de tumorigenicidade pode estar agravado pela manipulação destas células, tendo sido encontradas aberrações cromossómicas nas CEPi e a formação de teratomas em modelos animais <sup>121,122</sup>. Também ainda não é certo que estas células possuam características idênticas às células embrionárias, temendo-se que esteja mantida uma memória genética das células de origem, o que pode constituir uma limitação à sua segurança e eficácia <sup>123</sup>.

É reconhecido que para a utilização clínica das CEPi existe ainda um longo caminho, com etapas que passem pela simplificação da metodologia da reprogramação, melhoria da eficácia da indução, otimização dos meios de cultura, de seleção e de controlo de qualidade das células <sup>124</sup>. Tal como as células embrionárias não houve até à data nenhum ensaio clínico em Cardiologia com as CEPi.

### **1.3.4 Células estaminais do músculo esquelético**

O músculo esquelético tem capacidade para substituir as células musculares que vão sendo perdidas, no fisiológico *turnover* celular e parcialmente após uma agressão. As células satélite são pequenas células mononucleadas que estão adjacentes à membrana basal da fibra muscular. Descobertas em 1961, foi mais tarde confirmada a sua capacidade em se renovarem e de se diferenciarem em células musculares esqueléticas, num processo de

expansão extremamente produtivo, sendo capazes de originar 100 miofibrilhas musculares com as cerca de sete células presentes em apenas uma miofibrilha <sup>125,126</sup>.

As células satélite são facilmente obtidas através de uma biopsia muscular e expandidas em cultura, originando mioblastos – os precursores das células musculares esqueléticas e que têm sido utilizados em investigação no âmbito da medicina regenerativa. Apesar dos mioblastos esqueléticos serem células unipotentes, incapazes de se diferenciarem em cardiomiócitos, as suas características biológicas e estruturais são semelhantes, pelo que foram muito cedo alvo do interesse dos investigadores e candidatos ideais para utilização nos primeiros estudos clínicos. Uma capacidade dos mioblastos com especial interesse consiste na sua resistência à isquémia, uma potencial mais valia para a sua utilização em várias formas da doença coronária <sup>127</sup>.

Um grande número de estudos pré-clínicos avaliou o transplante autólogo, alogénico e xenogénico (entre espécies diferentes) de mioblastos esqueléticos em corações com lesão miocárdica <sup>128</sup>. A maioria mostrou uma melhoria funcional com a transplantação, embora os mecanismos deste efeito não estejam completamente esclarecidos, pois mesmo quando o número de células presentes era insuficiente a melhoria na função contráctil era evidente <sup>129</sup>. Além de uma eventual melhoria da contractilidade o benefício do transplante de mioblastos pode passar por:

- a) efeitos parácrinos de citocinas e fatores de crescimento por si libertados, com influência na angiogénese, na composição da matriz extracelular e nas células residentes;

- b) uma redução no stress da parede ventricular, pelo simples aumento da sua espessura e melhoria da elasticidade da cicatriz após lesão, limitando a dilatação e remodelação ventricular <sup>128</sup>.

No entanto os mioblastos não produzem algumas proteínas específicas das células cardíacas, como as proteínas dos discos intercalados, N-caderina e conexina 43, impossibilitando a sua integração eletromecânica com os

cardiomiócitos o que implica a ausência de sincronia da sua ação contráctil e potenciais riscos de disritmias fatais <sup>130</sup>. Outra limitação consiste na reduzida sobrevivência das células (cerca de 90% morrem após o transplante), sendo a causa provavelmente multifatorial e ligada a processos inflamatórios, à hipóxia, à apoptose e a inadaptação ao meio extracelular <sup>131</sup>.

Algumas destas limitações tiveram impacto nos estudos clínicos realizados, levando mesmo a um desinvestimento na sua investigação, como veremos mais à frente. Parte dos esforços foram redirecionados para a modificação dos mioblastos esqueléticos por manipulação genética, para capacitá-los para a síntese de proteínas específicas das células cardíacas ou para a expressão de fatores de crescimento, de forma a melhorar a sua sobrevivência e integração <sup>132</sup>. Estas novas estratégias necessitam de otimização e estão ainda em fase pré-clínica.

### **1.3.5 Células estaminais hematopoiéticas**

As células estaminais hematopoiéticas (CEH) são as responsáveis pela formação das células do sangue e do sistema imunitário. São hoje utilizadas em Medicina no tratamento de mais de 30 doenças hematológicas e oncológicas, desde que na década de 50 do século passado foi reconhecida a sua capacidade de substituir o componente celular da medula óssea <sup>133,134</sup>.

No presente, a colheita de CEH faz parte da atividade clínica habitual em várias áreas médicas. Estas células são fáceis de obter num número elevado, através de um simples aspirado de medula óssea ou da aferese do sangue periférico, após a sua mobilização com citocinas como o fator de estimulação de colónias de granulócitos (G-CSF). Não necessitam de uma extensa manipulação *ex vivo*, o que limita o risco de contaminação, de perda de viabilidade das células ou de alterações genéticas. O seu uso não se associa a questões éticas, e as questões legais ou regulatórias estão facilitadas pela sua presença na prática clínica atual.

Apesar da sua extensa utilização e intensa investigação algumas dificuldades persistem. As CEH crescem em cultura assemelhando-se a glóbulos brancos e a sua diferenciação e correta identificação baseiam-se em marcadores da superfície celular como o CD34 e CD133 <sup>135</sup>. Estes marcadores estão presentes nas CEH e desaparecem com a diferenciação celular, permitindo a sua separação, mas através de um processo de citometria de fluxo complexo e dispendioso - separador de células ativadas por fluorescência. Estes marcadores não são específicos e o resultado desta separação é um conjunto heterogéneo de células estaminais, de células progenitoras e de outras sem capacidade proliferativa. Por outro lado, e paradoxalmente tendo em conta o grande número obtido durante a sua colheita, a cultura e expansão das CEH é ainda difícil e pouco eficaz <sup>136</sup>.

Tendo presente estas dificuldades em selecionar as CEH da medula óssea, muitos estudos têm utilizado a população não fracionada de células mononucleares, ou seja as células do aspirado que permanecem após a simples separação por gradiente de densidade dos eritrócitos e das células polimorfonucleares. Esta população é bastante heterogénea sendo composta por 2 a 4 % de CEH em vários estádios de maturidade, por outras células estaminais ou progenitoras não hematopoiéticas (em muito menor número) e por células diferenciadas como linfócitos, monócitos e macrófagos <sup>137,138</sup>. A denominação de CEH tem sido frequentemente, e de forma incorreta, utilizada em sobreposição com as células mononucleares derivadas da medula óssea (CMNMO). Ao utilizar-se estas últimas, o que se faz é a administração de um vasto conjunto de células, algumas com funções e interações ainda não completamente esclarecidas.

Outros investigadores utilizaram a técnica de separação das células ativadas por fluorescência, para obter uma população mais homogénea e com maior concentração de CEH, embora com acréscimo considerável do custo e complexidade como já referido, e perdendo uma fração celular que pode por



si só, ou pela complexa e ainda não compreendida relação intercelular, ter um papel terapêutico importante.

A descoberta na medula óssea de células que expressam marcadores de células cardíacas indiferenciadas, a sua mobilização no contexto de enfarte para a circulação periférica e o seu alojamento no coração parecem indicar um papel das CEH na reparação cardíaca após uma agressão <sup>139,140</sup>. Embora tenha sido possível observar transdiferenciação *in vitro* das CEH em cardiomiócitos, a sua ocorrência *in vivo* é controversa e não acontece com a expressão necessária à regeneração miocárdica com significado clínico.

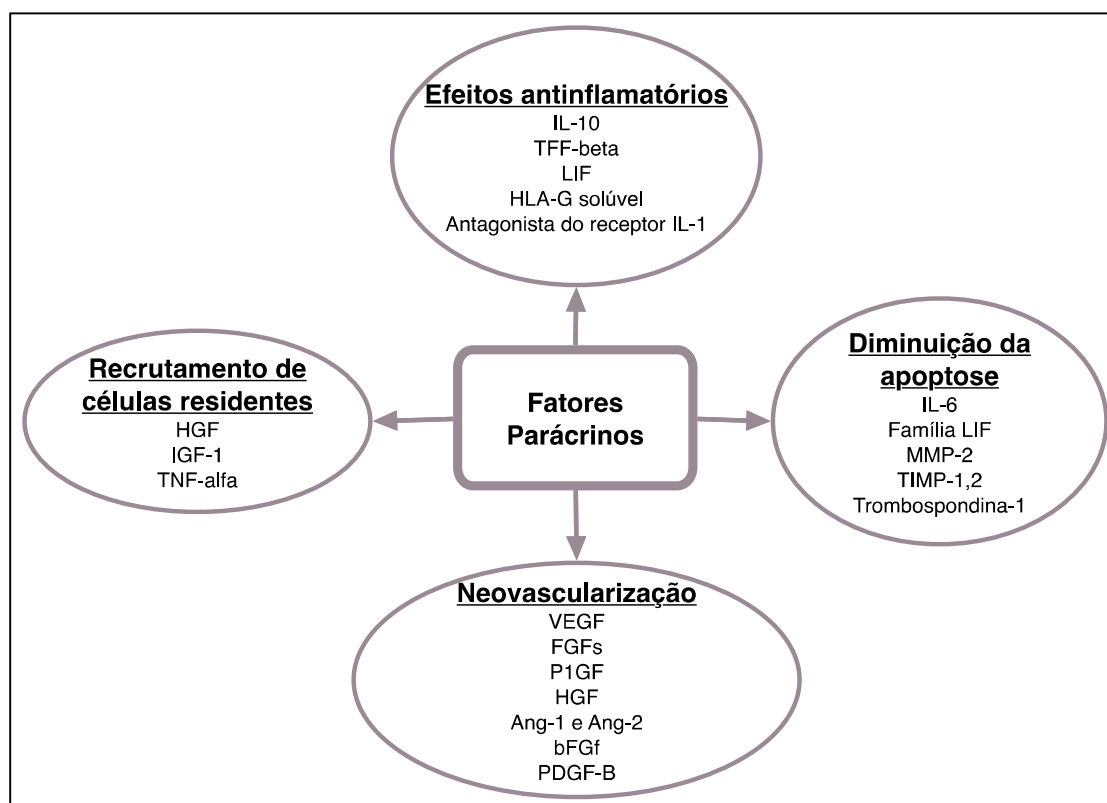
Os estudos em ratos com enfarte do miocárdio, provocado pela laqueação da descendente anterior, divergiram quanto à capacidade das células derivadas da medula óssea em promover a regeneração miocárdica ou a vasculogênese, com alguns a mostrar estes benefícios após o transplante celular <sup>99,100,141,142</sup> e outros a reportar resultados neutros <sup>101,143,144</sup>. Esta discrepância realça sobretudo a importância da aplicação rigorosa de metodologias com aceitação generalizada e replicáveis por outros grupos de investigação.

Num estudo de transplantação de CMNMO humanas após enfarte e utilizando o suíno como modelo animal de grande porte, observou-se a existência de uma melhoria da perfusão do miocárdio e da função ventricular, acompanhadas da redução da dimensão do enfarte <sup>145</sup>. Mais interessante, constatou-se a presença de células humanas na parede de um terço dos novos capilares formados na área peri-enfarte, demonstrando a sua incorporação no tecido recetor. Este estudo foi seguido por outros com metodologia semelhante, que também demonstraram o benefício do transplante autólogo, observando-se um aumento da densidade capilar e da função sistólica e uma melhoria da remodelação ventricular <sup>146,147</sup>.

Nos estudos clínicos tem sido constatada uma tendência para o benefício do transplante de células derivadas da medula óssea, em particular na sua

forma não fracionada e sobretudo no contexto de EAM. No entanto, sabe-se que apenas um número muito reduzido de células fica retido no tecido cardíaco após a sua administração, e dessas, a maioria não resiste às condições de isquemia e aos processos inflamatórios locais <sup>148,149</sup>. Este fato, associado à já referida ausência de transdiferenciação em células do tecido cardíaco, levou a que fosse proposto que o benefício do transplante das CMNMO seja o resultado de efeitos parácrinos.

Segundo a hipótese da atividade parácrina, o transplante das células tinha como efeito final a administração de um conjunto de citocinas e fatores de crescimento com benefício na inflamação, na isquemia, na apoptose e na ativação dos mecanismos de regeneração endógena do miocárdio (Figura 3) <sup>150,151</sup>. Desta forma as células passaram também a despertar o interesse da indústria farmacêutica, que mantendo uma abordagem mais convencional investe na procura de moléculas derivadas das células com benefício clínico.



**Figura 3 – Fatores parácrinos das células estaminais e os seus potenciais efeitos.**

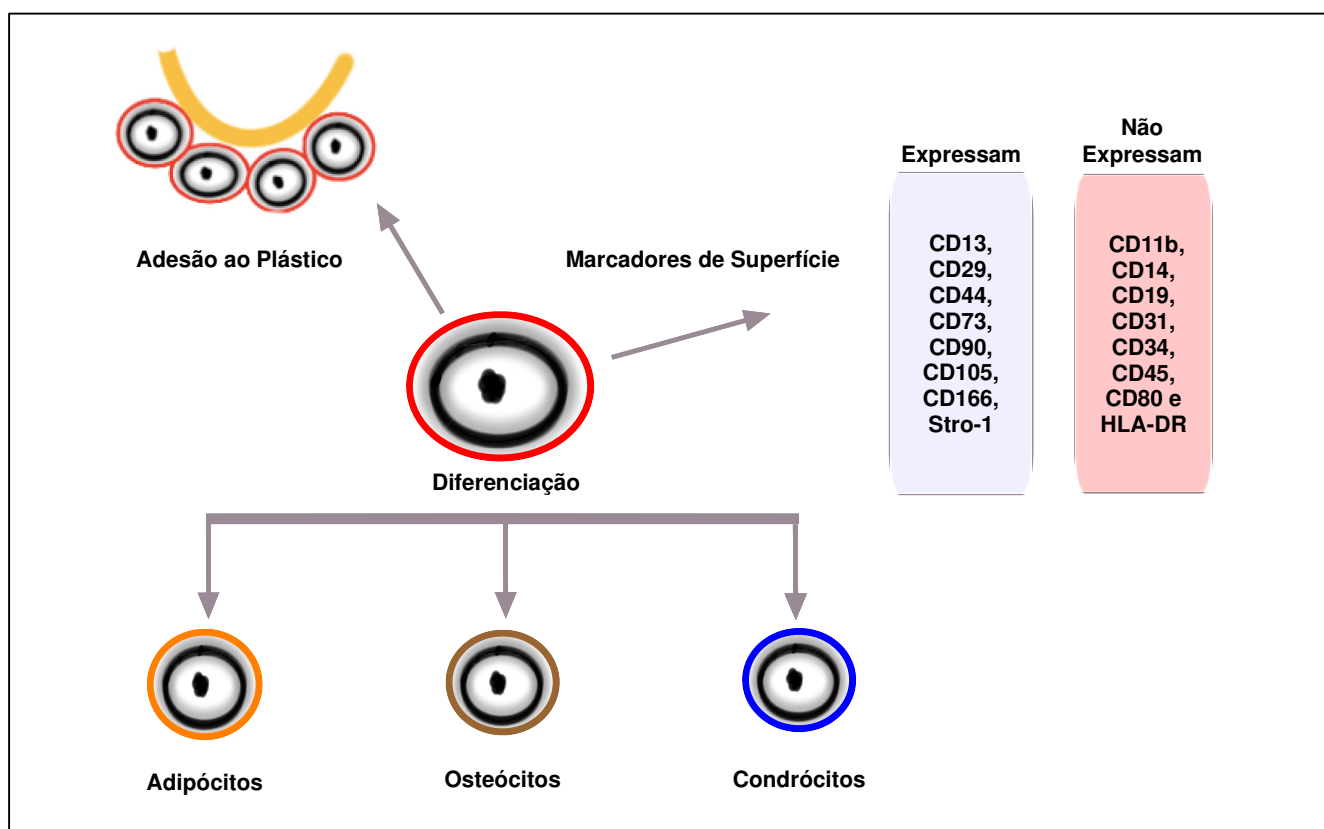
Ang – Angiopeitina; bFG – basic fibroblast growth factor; FGF - Fibroblast growth factors; HGF - Hepatocyte growth factor; HLA - Human leukocyte antigen; ILG - Insulin-like growth factor; IL- Interleucina; LIF - Leukemia inhibitory factor; MMP - Matrix metalloproteinases; P1GF - Placenta growth factor; PDGF - Platelet-derived growth factor; TGF - Transforming growth factor beta; TIMP - Tissue inhibitor of metalloproteinases; TNF - Tumor necrosis factor; VEGF -Vascular endothelial growth factor

### 1.3.6 Células estaminais mesenquimais

Das células estaminais não hematopoiéticas presentes na medula óssea as CEM foram as primeiras a ser descobertas <sup>152</sup>. Mais uma vez, esta designação abrange um conjunto heterogêneo de células que por definição respeitam três critérios (Figura 4):

a) têm a capacidade para aderir ao plástico em meios de cultura convencionais;

- b) expressam um padrão específico de marcadores antigênicos de superfície onde estão ausentes os marcadores da série hematopoiética;
- c) têm multipotência, diferenciando-se em linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica <sup>153</sup>.



**Figura 4 - Critérios estabelecidos para a definição de Células Estaminais Mesenquimais.** Capacidade para aderir ao plástico em meios de cultura convencionais; expressão e ausência de marcadores antigênicos de superfície; multipotência, com diferenciação em linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica .

Além da medula óssea, as CEM estão presentes em outros tecidos e órgãos, incluindo o coração e o tecido adiposo, sendo este último particularmente interessante pela sua disponibilidade e por permitir a obtenção de um grande número de células <sup>154,155</sup>. Independentemente da sua origem, estas células

partilham potencialidades que as tornam particularmente interessantes para a sua utilização clínica.

Está demonstrando que as CEM possuem uma grande plasticidade, podendo diferenciar-se em células das três camadas germinativas (Figura 2) <sup>156</sup>:

- a) endoderme (células do tecido hepático, pancreático e respiratório);
- b) mesoderme (adipócitos, osteócitos, endotélio, miócitos e cardiomiócitos);
- c) ectoderme (tecido nervoso, pele).

Esta transdiferenciação ocorre pela exposição a diferentes estímulos provenientes do meio de cultura. No caso dos cardiomiócitos derivados de CEM, observou-se a sua agregação em estruturas miotubulares, com capacidade contrátil e de sincronia após duas a três semanas de expansão <sup>157</sup>. Um estudo que avaliou doentes transplantados em dois diferentes contextos, transplante cardíaco ou de medula óssea, confirmou a presença de cardiomiócitos e de células endoteliais no coração transplantado proveniente do recetor, e de semelhante forma, detetaram-se novas células com origem no dador no coração de doentes submetidos a transplante de medula óssea, tendo sido as CEM de origem alogénica implicadas nesta renovação celular à distância <sup>158</sup>.

Outra particularidade importante das CEM está relacionada com as suas propriedades imunomoduladoras e com a possibilidade de serem células imunoprivilegiadas, ou seja, capazes de iludir os mecanismos de rejeição. Esta última capacidade resulta de não expressarem moléculas de classe II do sistema antigénio leucocitário humano, o principal complexo de histocompatibilidade, e de inibirem a células T citotóxicas e as células exterminadoras naturais (*Natural Killer*) <sup>159,160</sup>. Desta forma, está aberta a possibilidade do transplante alogénico, sem necessidade de imunossupressão, e da obtenção de um produto *of-the-shelf* pronto a administrar em qualquer altura. No entanto, existem alguns autores que contrariam a existência dos privilégios imunológicos das CEM, existindo evidência de que depois da sua diferenciação pode haver uma transição para

um estado imunogénico, sendo este um tema ainda não completamente esclarecido <sup>161,162</sup>.

Mais uma vez, a ocorrência de transdiferenciação *in vivo* das CEM em cardiomiócitos, após a transplantação celular, parece ser um fenómeno raro, e são os seus efeitos parácrinos provavelmente os principais responsáveis pelos eventuais efeitos positivos na reparação cardíaca (Figura 2) <sup>163,164</sup>.

Os resultados de alguns trabalhos indicam que provavelmente as CEM já fazem parte do sistema de reparação endógeno. Após uma agressão e o início de um processo inflamatório, estas células parecem ser mobilizadas para a circulação e migrarem para os tecidos lesados, onde se fixam e são ativadas <sup>165</sup>. A complexa rede de mecanismos moleculares deste processo de *homing* está ainda por definir, mas já foram identificadas várias quimiocinas e respetivos recetores, destacando-se o CXCR4, que tem como ligando o fator derivado do estroma-1 (SDF-1), tipicamente presente em regiões de inflamação <sup>166</sup>. Algumas estratégias de condicionamento celular e de modificação genética tem tentado amplificar estes mecanismos para modular o *homing* das CEM, ativando a expressão de recetores CXCR4 para estimular a sua ligação aos tecidos inflamados <sup>167,168</sup>. Este é um exemplo em como esta área do conhecimento é fértil em ramificações, criadas para tentar obter respostas que permitam ir redirecionando os esforços para criar uma terapêutica eficaz com a utilização de células.

Estudos pré-clínicos iniciados há cerca de uma década contribuíram para aumentar o interesse na utilização terapêutica das CEM no contexto de doença cardíaca. O transplante destas células em ratos mostrou a sua fixação e sobrevivência no coração, efeitos na neovascularização, melhoria da função ventricular e redução da massa de enfarte <sup>169–172</sup>. Também no modelo suíno as células mesenquimais mostraram capacidade de se fixarem na região de enfarte e de melhorar a função sistólica do ventrículo esquerdo <sup>163,173,174</sup>.

Em alguns dos estudos realizados com modelos animais houve achados relacionados com a segurança da utilização destas células. Alguns autores propuseram que a entrega destas células por via intracoronária estaria comprometida pelo seu tamanho, superior ao diâmetro dos capilares e, como tal, com potencial para comprometer a circulação coronária. Este risco está intimamente ligado com o tema desta tese e será desenvolvido mais à frente. Preocupante também foi o achado de tecido ósseo ectópico em alguns dos animais transplantados, provavelmente resultante da diferenciação das CEM em osteoblastos <sup>175,176</sup>. Não obstante as CEM já chegaram à investigação clínica como veremos no respetivo capítulo.

### 1.3.7 Células estaminais cardíacas

A capacidade de regenerar de forma completa vários tecidos e órgãos, incluído o coração, está perfeitamente estabelecida para algumas subespécies de salamandras e para o peixe zebra. O mesmo acontece para os mamíferos na sua fase embrionária ou neonatal. Contudo, é certo que esta capacidade se esvanece durante o desenvolvimento da fase adulta. Nos mamíferos adultos o coração faz parte dos órgãos classificados como tendo baixa capacidade regenerativa, juntamente com o rim, pâncreas e tecido nervoso <sup>177</sup>.

Como já referido, até há poucos anos acreditava-se que o coração fazia parte de um conjunto de órgãos pós-mitóticos e sem capacidade de renovação. Algumas descobertas recentes puseram em causa este conceito de várias formas:

- a) os cardiomiócitos adultos são capazes de regressar ao ciclo celular e proliferar em resposta a estímulos relacionados com uma agressão ou sobrecarga cardíaca, no que parece ser parte de um processo de reparação endógena, infelizmente insuficiente *in vivo* <sup>178–180</sup>.
- b) um maior conhecimento sobre a homeostasia celular cardíaca,

mostrou que à semelhança do que atualmente se acredita que acontece nos outros órgãos, existe uma contínua perda celular ao longo da vida, que ultrapassa largamente o número de células presentes no coração na idade adulta e o que implica um necessário processo contínuo de renovação celular<sup>103,181</sup>.

c) a descoberta de corações quiméricos após transplante cardíaco, com células do recetor a fazer parte da constituição do coração dador, parece também indicar que houve células capazes de migrar (dos resquícios auriculares ou eventualmente da própria medula óssea), diferenciarem-se, em cardiomiócitos ou células endoteliais e integrarem o tecido dador<sup>182,183</sup>;

d) mais recentemente e num estudo muito interessante, foi demonstrado através do nível de incorporação no ADN celular de elementos com carbono 14, presente na biosfera como resultado dos testes nucleares até à sua interdição em 1962, que os cardiomiócitos presentes no coração adulto têm idades diferentes e não foram todos gerados durante a fase embrionária, mas também durante a vida adulta<sup>184</sup>.

As explicações para a origem das células responsáveis por esta renovação cardíaca passam pela já referida migração para o coração de células estaminais da medula óssea e pela eventual desdiferenciação e proliferação dos cardiomiócitos residentes, originando células novas<sup>185</sup>. Acredita-se também que este é o resultado, pelo menos em parte, da existência de células estaminais no coração com capacidade para se diferenciarem nas várias células que constituem o miocárdio – as células estaminais cardíacas (CEC).

Nos últimos 10 anos foram identificados vários tipos de CEC, representando uma vez mais um grupo heterogéneo de células, todas com capacidade de autorrenovação, clonogenicidade e multipotência. As CEC são nomeadas pela sua forma de as identificar e isolar<sup>186</sup>. Assim temos as CEC c-Kit<sup>+</sup>, que possuem este recetor na sua superfície; as CEC Sca-1<sup>+</sup>, portadoras do antigénio de célula estaminal; as CEC da população lateral (*side population*), com propriedades que as fazem surgir “ao lado” nas análises por citometria



de fluxo; e as CEC derivadas de cardioesferas, capazes de crescerem em meios de cultura, formando conjuntos esféricos de células em suspensão. Alguns autores levantam a hipótese de estes vários tipos de CEC não serem mais de que diferentes fases de maturação de uma célula única <sup>187</sup>.

Estudos em animais mostraram que após uma agressão cardíaca, as CEC endógenas são ativadas e mobilizadas para a região da lesão, onde são capazes de proliferar e de se diferenciar em cardiomiócitos, células musculares lisas e células do endotélio vascular <sup>188,189</sup>. Apesar de tal não acontecer com a magnitude suficiente para se observar uma reparação expressiva do coração, existe a esperança que uma vez esclarecidos estes mecanismos, seja possível a ampliação deste processo de regeneração endógena, de forma a ter tradução terapêutica.

A avaliação pré-clínica da segurança e do potencial terapêutico do transplante de CEC teve resultados interessantes em modelos de doença cardíaca. Em roedores demonstrou-se nos anos mais recentes a capacidade dos vários tipos de CEC em se fixar no coração, aumentar o seu número e originar células das principais linhas celulares cardíacas <sup>104,190</sup>. Em alguns destes estudos também foi evidenciado um benefício na função cardíaca após a provocação de uma lesão isquêmica, com a melhoria da função sistólica do ventrículo esquerdo, a diminuição das dimensões ventriculares e a redução das dimensões de enfarte <sup>191,192</sup>. Outra evidência destes estudos pré-clínicos é que não parece haver superioridade de nenhum tipo específico de CEC em relação aos outros, quantos aos seus efeitos na regeneração e melhoria da função do coração <sup>186</sup>.

A transplantação de CEC em modelos animais de grande porte tem sido avaliada de forma menos intensa em comparação com os estudos com roedores. Os seus resultados têm mantido o interesse no efeito terapêutico destas células, sobretudo as CEC c-Kit<sup>+</sup> e as CEC derivadas de cardioesferas <sup>193–195</sup>. Para a entrega das células têm sido utilizadas a via intracoronária e a injeção intramiocárdica direta. De uma forma geral, foi demonstrada a

ocorrência de regeneração miocárdica e uma melhoria na função ventricular esquerda, embora por vezes não significativa, o que tem sido explicado pelo pequeno número de células que se fixam e sobrevivem no coração <sup>196</sup>. Em modelos de enfarte do miocárdio também foi observada a redução da cicatriz de enfarte <sup>193</sup>. Igualmente importante é a ausência de formação de neoplasias, de tecido ectópico, de disritmias ou de outros aspetos relacionados com a segurança das estratégias utilizadas.

### 1.3.8 Outras células estaminais

Além dos principais tipos de células estaminais já abordados, existe um conjunto de células de várias fontes e com características e propriedades específicas, que motivaram o interesse pela avaliação do seu efeito terapêutico na doença cardíaca. Algumas têm igualmente vantagens na acessibilidade da sua obtenção e na ausência de questões éticas ou legais. A maioria ainda não chegou a estudos clínicos, mas a rápida evolução da investigação neste campo aconselha a considerá-las como potenciais candidatas.

Este é um grupo heterogêneo de células, em níveis de investigação diferentes e com novos elementos a serem introduzidos com frequência. De forma sumária destacam-se neste grupo:

a) células progenitoras do endotélio – descobertas em 1997, estas células derivam da medula óssea, estão presentes na circulação em número muito reduzido e têm a capacidade de diferenciação na linhagem endotelial, contribuindo desta forma para a vasculogénese <sup>197</sup>. A sua caracterização é ainda ambígua e os mecanismos em que participam não estão ainda esclarecidos. A redução dos seus níveis em circulação é reconhecida como um importante biomarcador de risco cardiovascular, o que pode também constituir uma limitação para a sua utilização autóloga em doentes do foro cardíaco <sup>198</sup>. Após expansão *ex-vivo* estas células foram já utilizadas em

estudos clínicos no contexto de doença isquêmica, com alguns efeitos positivos <sup>199</sup>;

b) células derivadas do epicárdio – o tecido epicárdico tem uma relação próxima com o coração e tem sido visto como eventual fonte de células progenitoras com capacidade de diferenciação em cardiomiócitos e em outras células do tecido cardíaco <sup>200</sup>. Tem sido proposta a existência de uma ativação do epicárdio após uma agressão cardíaca e a sua participação na resposta subsequente, com migração de células e de fatores tróficos com efeitos parácrinos nas zonas de lesão <sup>201</sup>. Um fator de ativação das células pluripotentes do epicárdio, a timosina beta 4, tem sido apontado como um importante interveniente na eventual capacidade regeneradora do epicárdio, mas a sua utilização em modelos animais deu origem a resultados discrepantes <sup>202</sup>;

c) células estaminais do sangue do cordão umbilical – desde o final da década de 80 que o sangue do cordão umbilical é uma fonte reconhecida de células estaminais hematopoiéticas, tendo a sua utilização clínica começado nessa altura, quando o transplante destas células permitiu tratar um doente com anemia de Fanconi <sup>203</sup>. A presença de células multipotentes no sangue do cordão umbilical, com capacidade de gerar outras linhagens celulares além da hematopoiética, ainda é uma matéria controversa e que carece de uma demonstração definitiva. O surgimento de bancos de células privados tem contribuído para alguma polémica, pois são frequentemente acusados da promoção não fundamentada do potencial terapêutico destas células por motivos comerciais. Das limitações das células derivadas do sangue do cordão destacam-se o número limitado de células passíveis de serem obtidas nos 60-120 ml obtidos à nascença, obrigando à sua expansão para fins terapêuticos fora da área onco-hematológica, bem como o facto de a maioria dos adultos não ter o seu sangue armazenado, sendo obrigatória uma estratégia alogénica. Mais de uma dezena de estudos pré-clínicos concluíram pela existência de benefícios terapêuticos do transplante de células do cordão umbilical no contexto de EAM <sup>204</sup>. Os mecanismos da sua ação terapêutica não estão esclarecidos, sendo duvidosa a existência de regeneração miocárdica, admitindo-se a existência de semelhanças com os

efeitos parácrinos das células derivadas da medula óssea, embora num estudo animal comparativo estas tenham sido superiores no aumento da contractilidade cardíaca após lesão miocárdica <sup>205</sup>;

d) células da geleia do Wharton - esta é uma substância gelatinosa presente no cordão umbilical e uma potencial fonte de células mesenquimais. Com uma ontogenia mais próxima das células embrionárias estas células podem ter um potencial proliferativo e uma plasticidade superior à das células mesenquimais adultas <sup>206</sup>. Além disso, as suas propriedades imunomoduladoras podem também ser mais propícias a uma utilização alogénica <sup>206</sup>. Existe atualmente evidência de que após o seu transplante num modelo animal de enfarte, as células mesenquimais derivadas da geleia de Wharton são capazes de se diferenciar em cardiomiócitos e em células endoteliais, promovendo a regeneração cardíaca e a melhoria da função ventricular <sup>207,208</sup>;

e) células derivadas do líquido amniótico ou da placenta – os tecidos placentários têm origem nos primeiros estádios do desenvolvimento embrionário, havendo a possibilidade que permaneçam células com plasticidade semelhantes às células embrionárias e capazes de se diferenciarem nas três linhas germinais, sendo que a sua obtenção está isenta dos problemas éticos destas <sup>209</sup>. Por outro lado, a participação da placenta na tolerância materno-fetal indica a existência de capacidades imunomoduladoras específicas das suas células com eventuais vantagens terapêuticas. Células mesenquimais derivadas do tecido amniótico ou da placenta foram utilizadas em estudos pré-clínicos de enfarte do miocárdio, demonstrando-se a sua capacidade de fixação cardíaca e de diferenciação em cardiomiócitos, tendo o seu transplante efeitos positivos como o aumento da densidade vascular, diminuição da fibrose e das dimensões do ventrículo esquerdo <sup>210–212</sup>;

f) células derivadas da polpa dentária – o tecido do interior do dente tem células estaminais com capacidade de diferenciação em várias linhagens, incluindo a cardíaca. Para alguns autores, esta será uma das principais fontes de células mesenquimais no futuro, pela sua comprovada multipotência, facilidade de obtenção e preservação prolongada <sup>213</sup>. Estudos

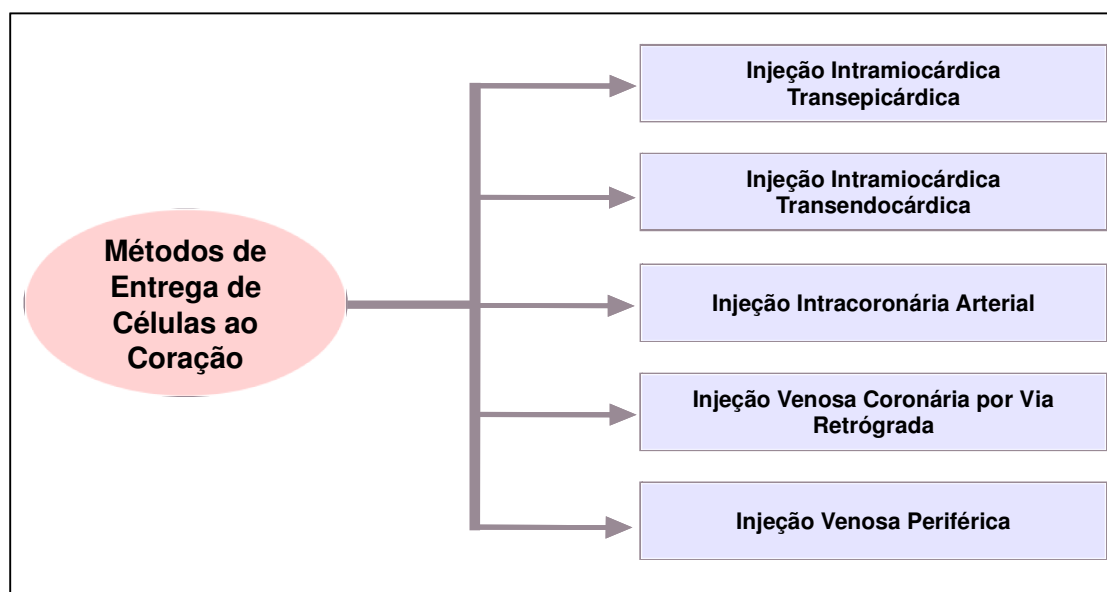
pré-clínicos demonstraram que o transplante destas células está associado a uma redução da cicatriz de enfarte e são promotoras potentes da angiogênese no contexto de isquemia/necrose do miocárdio <sup>214,215</sup>.

É pertinente referir a preocupação partilhada por muitos dos investigadores em que exista um melhor esclarecimento dos efeitos, dos mecanismos e dos riscos de utilização destas fontes de células estaminais antes da sua translação para estudos clínicos. Sem isso, e com esta variedade de candidatos, a quantidade e qualidade de informação gerada poderá contribuir para uma maior entropia do estado atual do conhecimento.

### **1.4 Métodos De Entrega Das Células**

Embora não seja a única estratégia em avaliação e com perspectivas de futuro, o transplante celular, autólogo ou alogénico, tem sido a principal forma proposta para a aplicação clínica de células. O método ideal de entregar as células ao coração ainda não está definido. Este será certamente o menos invasivo e o que conseguir um equilíbrio apropriado entre os riscos e as dificuldades técnicas inerentes, a eficácia em entregar o número necessário de células viáveis na região alvo e o custo associado. Este balanço pode variar com a patologia a tratar e com o tipo de célula, assim como da eventual necessidade da utilização de substâncias ou materiais adjuvantes à sua fixação e sobrevivência.

As formas encontradas para a entrega das células procuraram utilizar o conhecimento e as capacidades da prática clínica atual, embora outras tenham sido especificamente desenvolvidas para esta nova era da Terapia Celular. O rápido desenvolvimento nesta área motivou a publicação em 2010 das primeiras recomendações internacionais para a utilização das técnicas de entrega de produtos biológicos para regeneração cardíaca, assim como para o treino dos respetivos operadores <sup>216</sup>. De seguida apresentam-se os principais métodos utilizados até à data (Figura 5).



**Figura 5 – Formas de entrega de células ao coração.**

#### **1.4.1 Injeção intramiocárdica transepicárdica**

A injeção direta no interior do miocárdio é uma forma simples de entrega das células quando efetuada com o coração exposto por uma esternotomia, geralmente durante uma cirurgia cardíaca já planejada e com uma outra indicação clínica. Na maioria dos trabalhos já realizados esta via é associada a uma cirurgia de revascularização do miocárdio e no contexto de doença cardíaca isquêmica. Também é lícito prever que, caso a terapia celular mostre benefícios suficientes, a entrega direta de células poderá ser efetuada de forma independente e por procedimentos cirúrgicos menos invasivos e que obviem a esternotomia, por exemplo com uma minitoracotomia lateral e apoio endoscópico.

Este método possibilita a entrega de um grande número de células e a sua associação à implantação de substâncias ou materiais adjuvantes, e permite a visualização direta das regiões favoráveis à sua sobrevivência e ao desempenho da sua ação. Acredita-se atualmente que estas zonas sejam as que têm miocárdio viável na proximidade ou em fronteira com regiões de necrose, e tem sido estas o alvo para a injeção das células na maioria dos

estudos que utilizaram esta via.

A limitação da injeção intramiocárdica transepicárdica com maior expressão é obviamente a sua natureza mais invasiva, o que pode condicionar a sua utilização nos doentes sem outra indicação cirúrgica ou que tenham contraindicação ou risco cirúrgico elevado. Por outro lado, o balanço entre o risco e o benefício, efetuado previamente a qualquer ato médico, obriga a uma demonstração muito expressiva dos efeitos clínicos positivos de uma estratégia que se baseasse nesta via de entrega das células. Outras limitações importantes, sobretudo se comparadas com as técnicas percutâneas, é o maior custo das técnicas cirúrgicas, o maior consumo de recursos e a sua menor disponibilidade.

### **1.4.2 Injeção intramiocárdica transendocárdica**

A injeção intramiocárdica por via transendocárdica é uma técnica desenvolvida especificamente para a entrega de células. Baseia-se em cateteres dedicados com agulhas distais, que são avançados até ao interior da cavidade cardíaca através de um acesso arterial periférico e com o auxílio de fluroscopia. Sendo uma técnica percutânea, sem visualização direta do coração, a identificação das regiões alvo para a injeção segura e eficaz das células baseia-se necessariamente em técnicas de imagem avançadas. Destaca-se aqui a utilização dos sistemas tridimensionais de mapeamento eletromecânico, desenvolvidos para procedimentos eletrofisiológicos e de utilização rotineira nos dias de hoje, e que possibilitam ao operador identificar as zonas de perinecrose e aí posicionar corretamente o cateter para a punção do miocárdio e posterior entrega das células.

Esta técnica partilha de algumas das vantagens da injeção transepicárdica, nomeadamente a possibilidade de entregar um número grande de células, de qualquer tipo, com outros coadjuvantes se necessário e de forma precisa nas regiões tidas como alvo. Tem ainda a vantagem, inerente aos procedimentos

percutâneos, de não necessitar de anestesia geral, ser menos cruenta e permitir rapidamente o regresso à normal atividade do doente. Está no entanto dependente de meios tecnológicos avançados, necessita de treino específico dos operadores e do desenvolvimento de uma curva de aprendizagem, tem custos financeiros significativos e, sendo uma técnica relativamente demorada, despende um tempo valioso dos laboratórios de hemodinâmica.

A exequibilidade e segurança da injeção intramiocárdica foi demonstrada em vários estudos clínicos e já existem em comercialização alguns cateteres dedicados: Myostar™ (Biosense Webster, Inc.); Helical Injection Catheter™ (Biocardia, Inc.); TransAccess® MicroLume™ (Tranvascular, Inc.), MyoCath™ (Bioheart, Inc.).

### **1.4.3 Injeção intracoronária arterial**

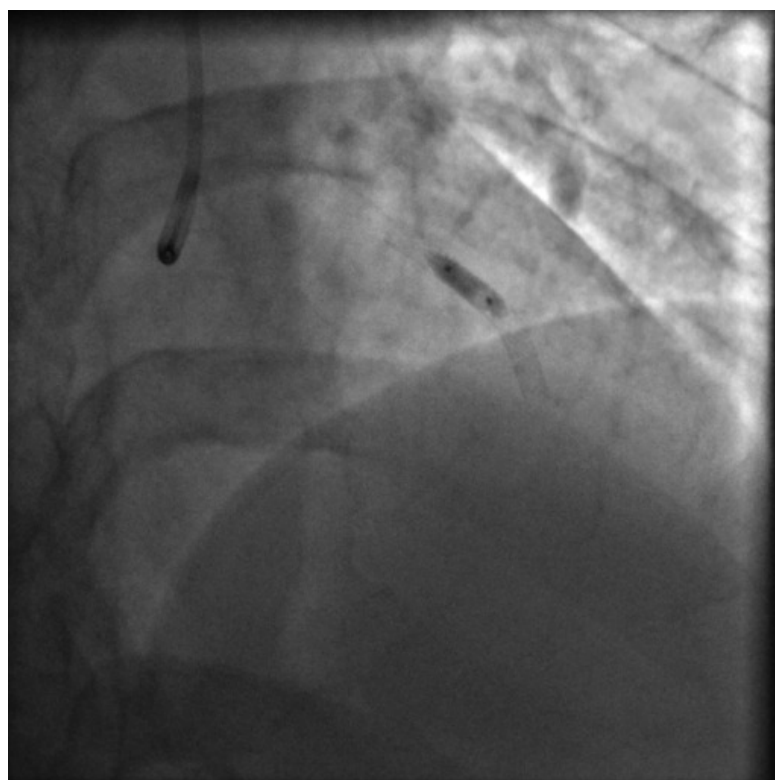
Os procedimentos intracoronários fazem parte da atividade clínica habitual desde há quase quatro décadas e os cardiologistas de intervenção estão perfeitamente familiarizados com os seus aspetos técnicos, sendo a revascularização coronária percutânea uma parte considerável da sua atividade. A injeção intracoronária através de um cateter é a forma mais simples, expedita e acessível de entregar células diretamente ao coração.

Apesar de ser possível aceder a regiões específicas do miocárdio, ao seleccionar os ramos arteriais que as irrigam, a administração das células por esta via é realizada de forma mais dispersa e menos dirigida do que a injeção intramiocárdica. Esta forma de entrega depende também da passagem das células do interior dos vasos para os tecidos, sem a qual estas entram na circulação sistémica podendo ser destruídas ou fixarem-se noutros órgãos, onde a sua ação não só não tem benefícios terapêuticos como poderá ter potenciais riscos. Outra limitação importante é não ser exequível na presença de oclusão das artérias coronárias ou de se associar a um acréscimo do risco



se existir doença difusa.

Não obstante as limitações referidas, esta tem sido a via mais utilizada nos ensaios clínicos, em particular no contexto de EAM, onde é possível utilizar a própria artéria culpada. Em 2002, Strauer utilizou a via intracoronária para a realizar o transplante autólogo de CMNMO para o tratamento de doentes com EAM <sup>217</sup>. A sua metodologia, apelidada de *stop-flow*, foi posteriormente adotada pela maioria dos estudos clínicos subsequentes no mesmo contexto clínico. Esta consiste em ocluir transitoriamente a artéria culpada com a insuflação de um cateter de balão *over-the-wire* no interior do stent, colocado durante a intervenção de revascularização, com o intuito de prevenir o fluxo retrógrado, sendo as células injetadas distalmente à oclusão através do lúmen do próprio cateter de balão (Figura 6).



**Figura 6 – Entrega intracoronária de CMNMO com a técnica de *stop flow* num doente com enfarte agudo do miocárdio.** Cateter de balão *over-the-wire* insuflado no interior do um stent colocado no segmento médio da artéria descendente anterior

durante a intervenção coronária percutânea primária. As células foram injetadas distalmente ao balão através do seu lúmen.

A necessidade e as putativas vantagens em interromper o fluxo coronário durante a administração das células têm sido questionadas <sup>218</sup>. A sua execução na ausência de um stent previamente colocado é passível de lesionar a parede da artéria, aumentando os riscos do procedimento, o que constitui uma limitação significativa em contextos clínicos onde não está indicado a colocação de stents coronários. A simples infusão intracoronária das células, podendo ser seletiva com o auxílio de um microcateter, será provavelmente tão eficaz e mais segura que a técnica de *stop-flow* e foi esta a escolhida para os trabalhos desta tese.

### **1.4.4 Injeção venosa coronária por via retrógrada**

Nesta técnica, desenvolvida para a entrega de células, é colocado um cateter de balão no interior do seio coronário, guiado por fluroscopia e, à semelhança do descrito para a via intracoronária, o fluxo do seio coronário é interrompido com a insuflação do balão a baixa pressão, sendo as células injetadas através do lúmen do cateter de balão. Esta via tem a potencial vantagem de não depender de vasos de resistência, ao contrário da circulação arterial. Além disso, a pressão transvascular após a provocação da estagnação venosa poderá ser mais favorável à passagem das células para o tecido miocárdico <sup>219</sup>. Esta forma de entrega também obvia as limitações associadas à presença de doença coronária, assim como os riscos de obstrução da microcirculação. Contudo, este é um procedimento complexo e que depende da anatomia variável do seio coronário.

### **1.4.5 Injeção venosa periférica**

A simples injeção numa veia periférica é a forma mais simples e menos invasiva de entregar células com potencial terapêutico. No entanto, a sua

eficácia depende da capacidade dessa determinada célula em chegar ao coração e aí se alojar, sem que antes fique retida noutro órgão. As células entregues por esta via estão sujeitas a um efeito de primeira passagem na circulação pulmonar, sendo reduzido o número das que são posteriormente encontradas no coração. Até ao presente momento, a baixa capacidade em entregar um número significativo de células tem limitado a expansão desta via de entrega, especialmente quando comparada com a injeção intracoronária<sup>220,221</sup>. A melhor compreensão dos mecanismos de *homing* e fixação cardíaca das células pode no futuro providenciar soluções que ultrapassem estas limitações, tornando esta a via mais apta para a utilização clínica.

### 1.4.6 Riscos da injeção intracoronária de células mesenquimais

Existem receios relacionados com a segurança da administração de CEM por via intracoronária. O seu tamanho de 20 µm é claramente superior ao diâmetro dos capilares coronários (10 µm em média), podendo levar à sua oclusão e à ocorrência de microenfartes ou ao fenómeno de *no reflow* coronário, já demonstrados em alguns estudos animais.

Em 2004, Vulliet *et al.* realizaram um estudo pioneiro com injeção intracoronária de CEM em 6 cães saudáveis<sup>222</sup>. Utilizaram uma dose de  $0.5 \times 10^6$  CEM / Kg, o que se traduziu em cerca de  $10 \times 10^6$  CEM injetadas. Todos os animais apresentaram alterações eletrocardiográficas agudas, com elevação de ST e inversão da onda T, compatíveis com isquémia do miocárdio. Nos dois animais em que foram avaliados os níveis de troponina, observou-se a sua elevação nas primeiras 24 horas. A avaliação histológica e imuno-histoquímica mostrou evidência de enfarte do miocárdio em todos os animais.

Dois anos depois, Freyman *et al.* compararam num modelo suíno de EAM três vias para administração de  $60 \times 10^6$  CEM: intracoronária;

transendocárdica e por veia periférica <sup>221</sup>. No grupo dos 6 animais selecionados para a via intracoronária, em 3 verificou-se um compromisso do fluxo coronário distal durante a administração, embora esta tenha recuperado e não tenha havido tradução clínica.

Utilizando um modelo canino de enfarte do miocárdio, Perin *et al.* compararam a injeção de CEM por via intracoronária com a sua administração por via transendocárdica num estudo efetuado em 2008 <sup>223</sup>. Todos os animais receberam  $100 \times 10^6$  CEM. Numa avaliação prévia, 9 animais saudáveis receberam as células através de uma infusão intracoronária em três velocidades diferentes:  $1 \times 10^6$  células / min (n= 5),  $1,5 \times 10^6$  células / min (n=2) e  $3 \times 10^6$  células / min (n =2). Nos animais do grupo de menor velocidade não se observou nenhuma elevação dos marcadores cardíacos, ao contrário da elevação de duas e sete vezes superior ao limite definido, respetivamente nos grupos de velocidade intermédia e alta. No entanto, a avaliação histopatológica destes animais não mostrou obstrução capilar pelas CEM. No estudo controlado que se seguiu, 7 animais receberam as células por via intracoronária à velocidade mais baixa, 7 dias após a provocação do EAM. Um animal desenvolveu *no reflow* coronário, a que se seguiu fibrilhação ventricular incessante e morte durante o procedimento. Um outro animal morreu dois dias depois da administração por necrose intestinal. No grupo recetor de células por via transendocárdica não houve eventos relacionados com a segurança.

Num outro estudo realizado em 2010, Grieve *et al.* utilizaram duas ovelhas saudáveis, tendo avaliado as modificações dos níveis dos marcadores bioquímicos de necrose miocárdica, as alterações histológicas do tecido cardíaco e a avaliação por ressonância magnética com utilização de gadolínio, após a administração intracoronária de CEM <sup>224</sup>. Um dos animais recebeu uma dose de  $25 \times 10^6$  CEM, tendo-se observado uma elevação ligeira da troponina nas primeiras 24 horas e um aumento da celularidade intersticial por infiltração linfocitária, mas não houve evidência histológica de necrose nem imagens de realce tardio na ressonância magnética. A segunda ovelha

recebeu uma dose três vezes superior,  $75 \times 10^6$  CEM, e apresentou uma maior elevação da troponina, um aumento da celularidade intersticial semelhante à do outro animal, mas acompanhada de alterações compatíveis com obstrução dos pequenos vasos e de enfarte do miocárdio, sendo este também bem evidenciado pelo realce tardio observado na ressonância magnética.

Destes estudos pré-clínicos conclui-se que a possibilidade de as CEM obstruírem a microcirculação coronária existe, estando aparentemente relacionada com a quantidade de células e a sua velocidade de infusão. No entanto, este é um fenómeno que não se observou em todos os animais, não se conhecendo todas as variáveis que determinam um comportamento diferente. O melhor esclarecimento da segurança da injeção intracoronária das CEM é importante para o desenho de futuros ensaios clínicos, o que não impediu a concretização de alguns como será apresentado nos capítulos seguintes.

É também relevante destacar que a isquémia resultante da obstrução microvascular pode ditar a não sobrevivência e como tal a não permanência destas células no coração, havendo evidência que a maior parte das CEM entregues por via intracoronária ficam presas ao nível pré-capilar, onde são destruídas<sup>225</sup>. Desta forma, a compreensão dos efeitos na microcirculação coronária é também importante para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes.

## **1.5 Investigação Clínica Atual Em Terapia Celular**

### **1.5.1 Considerações gerais**

A exploração do potencial terapêutico das células no contexto de doença cardíaca começou há mais de uma década. A maioria dos estudos efetuados são de pequena dimensão e pretendem estabelecer a segurança e exequibilidade de um determinado tipo celular e abordagem terapêutica.

Apesar de, até há data, não terem surgido efeitos secundários, reações adversas ou complicações significativas relacionadas com os diferentes procedimentos envolvidos, alguns autores criticam a rapidez com que se passou dos estudos pré-clínicos para a investigação humana <sup>226,227</sup>. O estabelecimento de uma estratégia terapêutica baseada em células depende de um conjunto complexo de variáveis, muitas ainda mal definidas, e dependentes de mecanismos moleculares e celulares que ainda carecem de melhor esclarecimento <sup>228</sup>.

Outra apreciação comum sobre a investigação clínica efetuada baseia-se na heterogeneidade da metodologia utilizada e das variáveis analisadas pelos diferentes estudos, o que dificulta a comparação dos resultados e a definição de uma estratégia eficaz. Na verdade, devido à reduzida dimensão dos estudos, muitos dos autores optam pela avaliação de múltiplas variáveis biológicas relacionadas com os processos fisiopatológicos envolvidos - os *surrogate endpoints*. O mais utilizado na investigação clínica tem sido a FEVE a qual é um forte predizente da mortalidade no contexto de doença cardíaca <sup>229</sup>, sendo a sua avaliação efetuada por vários métodos de imagem, sobressaindo a ecocardiografia como o mais acessível e a ressonância magnética como o mais fidedigno e com menor variabilidade.

Os métodos de imagem, onde se incluem também a cintigrafia de perfusão do miocárdio com tomografia computadorizada com emissão de fóton único (SPECT) e a tomografia por emissão de positrões, têm tido um importante papel na investigação neste campo, ao permitirem a avaliação das dimensões de enfarte e da cicatriz miocárdica, a quantificação de miocárdio viável e o estudo da contractilidade regional, cuja modificação pode refletir a ocorrência da pretendida regeneração miocárdica.

Muitos dos ensaios clínicos utilizam também *surrogate endpoints* não dependentes de métodos de imagem. A monitorização eletrocardiográfica tem permitido o estudo do potencial pró-arritmico e do risco de morte súbita.

A tolerância ao esforço e a capacidade funcional têm sido avaliadas por alguns autores com o teste da marcha dos seis minutos ou com a determinação do consumo máximo de oxigénio durante uma prova cardiorrespiratória. Marcadores bioquímicos, como os péptidos natriuréticos, também dão informação sobre a modificação do estágio funcional dos doentes e têm sido utilizados, em particular no contexto de insuficiência cardíaca.

As diferentes combinações destas variáveis clínicas e dos métodos para a sua determinação, criaram uma diversidade de resultados, por vezes inconsistentes ou incongruentes, o que no geral torna difícil a conclusão sobre o verdadeiro potencial da terapia celular. A isto junta-se o fato de vários estudos terem sido realizados sem grupo controlo, de forma aberta e não randomizada.

Não obstante as limitações apresentadas, são dezenas os estudos clínicos já realizados, com milhares de doentes incluídos, divididos por três cenários clínicos: EAM, cardiomiopatia isquémica crónica e CMD. Estes estudos providenciaram um manancial de conhecimento, cuja análise é importante para o desenvolvimento de futuras estratégias com maior possibilidade de sucesso.

### **1.5.2 Investigação no enfarte agudo do miocárdio**

#### **1.5.2.1 Células estaminais hematopoiéticas**

Uma parte considerável dos ensaios clínicos já realizados utilizou CEH autólogas em doentes com EAM. No início do milénio alguns estudos pioneiros realizados na Europa iniciaram a investigação clínica nesta área.

Strauer *et al.* publicaram em 2001 um caso isolado de um doente de 46 anos com EAM anterior sujeito a intervenção coronária percutânea e implantação de stent na descendente anterior <sup>217</sup>. Seis dias depois do evento agudo

recebeu  $12 \times 10^6$  CMNMO injetadas na artéria culpada através de um cateter de balão insuflado no interior do stent como já descrito. Os resultados apresentados foram francamente favoráveis, com uma redução às 10 semanas de evolução da área de enfarte de 24,6 % para 15,7 % da circunferência cardíaca (avaliada por ventriculografia), acompanhada de uma melhoria na ordem dos 20 a 30% da FEVE, do índice cardíaco e do volume sistólico. No ano seguinte o mesmo grupo apresentou os resultados de 10 doentes tratados com a mesma estratégia, comparados com um grupo controlo, não randomizado, composto por outros 10 doentes <sup>230</sup>. O grupo tratado recebeu em média  $28 \times 10^6$  CMNMO e, após 3 meses, apresentou uma redução significativa da região de enfarte determinada por ventriculografia, sendo esta menor do que a do grupo controlo. A FEVE teve uma melhoria não significativa nos dois grupos, sendo de destacar que a maioria dos doentes tinha boa função sistólica mesmo antes da inclusão no estudo. Também importante é o facto de não ter havido eventos adversos relacionados com a obtenção do aspirado da medula óssea e com a entrega intracoronária das células.

Em 2002 é publicado o TOPCARE-AMI, igualmente com 20 doentes, mas desta vez randomizados para receber por via intracoronária CMNMO ou células progenitoras obtidas do sangue periférico, 4 dias após o evento agudo <sup>231</sup>. Estes dois grupos foram comparados com um grupo de referência, emparelhado quanto à função ventricular esquerda, localização e dimensão do enfarte. A terapia celular associou-se a uma melhoria significativa aos 4 meses da FEVE ( $51,6 \pm 9,6\%$  para  $60,1 \pm 8,6\%$ ;  $p=0,003$ ) e à redução do volume ventricular ( $56,1 \pm 20$  mL para  $42,2 \pm 15,1$  mL;  $p=0,01$ ), ao contrário do que aconteceu no grupo de referência onde não houve alterações com significado. Não houve diferenças entre os dois grupos tratados com células. A avaliação por tomografia por emissão de positrões mostrou um aumento na viabilidade miocárdica na região de enfarte. Mais uma vez, não houve eventos relacionados com a segurança da terapia celular.

Aos anteriores trabalhos pioneiros, seguiu-se uma primeira geração de



estudos controlados e randomizados, alguns com seguimento a longo prazo, que partilham a utilização de CMNMO, entregues por via intracoronária com a técnica de *stop flow* <sup>231–241</sup>. As suas principais características estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1 – Primeira geração de ensaios clínicos utilizando células estaminais no contexto de EAM.** ↓ – Diminuição; ↑ – Aumento; Auto – Autólogo; CMN-Células Mononucleares; CMNMO – Células Mononucleares derivadas da Medula Óssea; CMO – Células derivadas da Medula Óssea; c – grupo controlo; CPCs – Células Progenitoras derivadas do Sangue Periférico; FE – Fração de Encurtamento; Eco – Ecocardiografia; IC – Injeção Intracoronária; AngVE – Angiografia do Ventrículo Esquerdo; FEVE – Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo; EAM – Enfarte Agudo do Miocárdio; RM – Ressonância Magnética; ICP – Intervenção Coronária Percutânea; r – randomizado; SP- Sangue Periférico; SPECT – Tomografia Computorizada por Emissão de Fotão Único; trat. – tratado; VTDVE – Volume Telediastólico do Ventrículo esquerdo.

Estudo	Desenho	Placebo	No. Doentes trat./contr.	Tipo de Células	No. Células Injetadas	Via Entrega	Dias após EAM ou ICP	Método de Imagem	Follow-up (meses)	Resultados com Significado Estatístico (em comparação com o grupo controlo)
<b>TOPCARE-AMI (2002-2011)</b> <sup>231-232</sup>	r, c	Não	29/30/11 (CMNMO / CPCs/ c.	Auto CPCs ou SP- CMN	$1.6 \pm 1.2 \times 10^7$ CPCs ou $2.13 \pm 0.75 \times 10^8$ CMO	IC	3-7	Eco, AngVE, RM	4, 12, 60	↓ VTDVE; ↑ FE; ↓ Dimensão Enfarte
<b>BOOST (2004-2009, I)</b> <sup>233-234</sup>	r, c	Não	30/30	Auto CMO	$2.46 \pm 0.94 \times 10^9$	IC	6	RM, Eco	6, 18, 60	↑ FEVE Global (6 meses); Sem diferenças aos 18 e 60 meses
<b>REPAIR-AMI (2006-2010, III)</b> <sup>235</sup>	r, c	Sim	101/103	Auto CMO	$2.36 \pm 1.74 \times 10^8$	IC	3-7	AngVE, RM	4, 12, 24	↑ FEVE
<b>Janssens (2006, II)</b> <sup>236</sup>	r, c	Sim	33/34	Auto CMNMO	$2 \times 10^8$	IC	1	Eco, RM	4	= FEVE; ↓ Dimensão Enfarte
<b>ASTAMI (2006, II)</b> <sup>237</sup>	r, c	Não	50/50	Auto CMNMO	$6.8 \times 10^7$	IC	6	SPECT, RM, Eco	6	Sem diferenças
<b>TCT-STAMI (2006,II)</b> <sup>238</sup>	r, c	Sim	10/10	Auto CMNMO	$4 \times 10^7$	IC	1	Eco	6	↑ FEVE
<b>Meluzin (2006,II)</b> <sup>239</sup>	r, c	Não	22/22/22	Auto CMNMO	$1 \times 10^7$ (dose baixa) $1 \times 10^8$ (dose alta)	IC	7	Eco	3	↑ FEVE (dose alta)
<b>Cao (2009,II)</b> <sup>240</sup>	r, c	Sim	41/45	Auto CMNMO	$5 \pm 1.2 \times 10^7$	IC	7	SPECT, Eco	6, 48	↑ FEVE
<b>BALANCE (2009)</b> <sup>241</sup>	c	Não	62/62	Auto CMO	$6.1 \pm 3.9 \times 10^7$	IC	$7 \pm 2$	AngVE, Eco	3, 12, 60	↓ Mortalidade

Estes estudos distinguem-se sobretudo pelo número de células utilizadas, pelo tempo de evolução do EAM na altura da sua entrega, pela metodologia de processamento do aspirado medular e pelos *endpoints* clínicos avaliados. De uma forma geral, não houve eventos relacionados com a segurança, tendo alguns estudos apresentado resultados consentâneos com benefício do grupo tratado, enquanto outros tiveram um efeito neutro.

Esta dicotomia é bem ilustrada pela comparação dos dois maiores estudos deste grupo. O ensaio duplamente cego REPAIR-AMI é o maior, com 204 doentes incluídos em 16 centros alemães e 1 suíço, randomizados para um grupo tratado com células e para um grupo controlo tratado com placebo, entre o 3º e o 6º dia após o evento agudo <sup>235</sup>. Aos 4 meses de evolução, o grupo tratado apresentou um maior aumento da FEVE (48,3% para 53,8%,  $5,5 \pm 7,3\%$  vs. 46,9% para 49,9%,  $3 \pm 6,5\%$ ;  $p=0,01$ ) e uma redução significativa do *endpoint* combinado de morte e recorrência de enfarte do miocárdico (2% vs. 10%;  $p=0,02$ ). Estes benefícios continuaram a estar presentes no seguimento efetuado aos 5 anos, com manutenção da melhoria da FEVE e uma tendência para uma mortalidade total menor, com 15 doentes falecidos no grupo controlo e 7 no grupo tratado ( $p=0,07$ ). Não houve diferenças quanto à ocorrência de doença neoplásica e de morte súbita, o que acrescenta evidência à segurança da utilização destas células a longo prazo <sup>242</sup>.

Por outro lado, o estudo sem placebo ASTAMI, que incluiu 100 doentes de dois centros noruegueses, não conseguiu demonstrar qualquer diferença com a utilização de uma estratégia semelhante <sup>237</sup>. Aos 6 meses a FEVE avaliada por SPECT, ecocardiografia e ressonância magnética não variou de forma significativa em nenhum dos grupos e foi semelhante entre eles. Não houve efeitos adversos relacionados com o procedimento experimental, com exceção da contaminação do aspirado da medula por *Staphylococcus* coagulase negativo em um doente, tratado posteriormente com vancomicina e sem desenvolvimento de infeção. Estes resultados mantiveram-se na avaliação aos 3 anos, observando-se uma evolução clínica semelhante nos

dois grupos <sup>243</sup>.

A discussão científica desencadeada pelas discrepâncias entre estes dois ensaios clínicos espelha bem a particular complexidade da investigação clínica nesta área <sup>244,245</sup>. Não existindo um produto único, de dosagem especificada, como acontece com os fármacos, simples diferenças no protocolo de processamento celular, na qualidade e número de células, na sua viabilidade e no próprio desenho do estudo, podem redundar em resultados finais diferentes. Nos dois estudos foram obtidos 50 ml de aspirado de medula óssea, no entanto, o número de células injetadas no REPAIR AMI foi consideravelmente superior (média de  $198 \times 10^6$ ) comparado com o do ASTAMI (média de  $68 \times 10^6$ ), o que pode estar associado à utilização de um protocolo de processamento celular mais eficaz no primeiro. Também as condições de armazenamento celular durante a noite no ASTAMI (as células só foram entregues no dia seguinte à colheita na grande maioria dos doentes) podem ter influenciado negativamente a sua capacidade migratória e consequentemente o seu potencial terapêutico <sup>244</sup>. De realçar também que, se por um lado o REPAR AMI beneficia de um desenho mais robusto, sendo verdadeiramente multicêntrico, duplamente cego e controlado com placebo, o ASTAMI apresenta uma consistência na avaliação da FEVE por três métodos de imagem independentes.

Ao abordar a diversidade dos resultados obtidos nesta primeira vaga da investigação clínica é de destacar também o estudo BOOST, que avaliou por ressonância magnética a evolução da FEVE em 60 doentes randomizados para um grupo tratado e um grupo controlo sem placebo [228]. Os investigadores apresentaram um aumento de 6,7 % aos 6 meses nos doentes tratados contra apenas 0,7% no grupo controlo ( $p=0,0026$ ). Contudo este benefício na melhoria da FEVE não foi sustentado ao longo do tempo, tendo a avaliação aos 18 meses e aos 5 anos mostrado não existir diferenças entre os grupos <sup>246,234</sup>.

Em Portugal foi também realizado o estudo GENESIS, resultante da colaboração do Serviço de Cardiologia do Hospital de Santa Marta e do

Serviço de Hematologia do Hospital Santo António dos Capuchos. É um estudo randomizado, controlado sem placebo, desenhado à semelhança do estudo BOOST para avaliar o transplante autólogo de CMNMO no contexto de EAM, tendo terminado em 2014 por dificuldade na inclusão de doentes. Os resultados dos 43 doentes estão apresentados nas Tabelas 2,3 e 4. Não houve nenhum evento adverso realizado com a obtenção das células ou com a sua entrega intracoronária, da mesma forma, não houve nenhuma evidência de benefício e a FEVE avaliada por ecocardiograma foi semelhante nos dois grupos. Durante o seguimento houve um evento fatal no grupo tratado por AVC aos 2 meses. Os resultados da ressonância magnética aguardam a finalização da sua análise.

**Tabela 2 – Características de base da população.** Médias e desvio padrão, diferenças avaliadas com o teste  $\chi^2$  para as variáveis categóricas e teste T de Student para as variáveis contínuas .

	Controlo	Tratados	P
Doentes (nº)	24	19	
Idade (anos)	58,7 $\pm$ 13	51,1 $\pm$ 12	0,942
Sexo masculino	23	16	0,152
Diabéticos	5	2	0,457
Hipertensos	13	11	0,515
EAM anterior	19	13	0,887
Dor-ICP (horas)	5,8 h $\pm$ 5	5,7 h $\pm$ 4	0,968
CK máximo (U/L)	2824 $\pm$ 465	3357 $\pm$ 378	0,280
FEVE (%)	48 $\pm$ 4	51 $\pm$ 6	0,348
FEVE <50%	12	10	0,967

CK – creatina quinase. EAM – enfarte agudo do miocárdio. ICP – intervenção coronária percutânea. FEVE – fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

**Tabela 3 – Eventos adversos intra-hospitalares.** Uma complicação no grupo controle relacionada com embolização de trombo do ventrículo esquerdo para o membro inferior esquerdo.

	Controle	Tratados
Relacionados com Aspirado de MO	X	0
Relacionados com entrega IC	X	0
Complicações IH	1	0
Eventos adversos	0	0
Mortalidade	0	0

IC – intracoronária. IH – intra-hospitalar. MO – medula óssea.

**Tabela 4 – Fração de ejeção do ventrículo esquerdo avaliada por ecocardiografia aos 6 meses, perfil disrítmico na avaliação eletrocardiográfica contínua de 24 horas e evolução clínica a um ano.** Médias e desvio padrão, diferenças avaliadas com o teste  $\chi^2$  para as variáveis categóricas e teste T de Student para as variáveis contínuas .

	Controle	Tratados	P
FEVE (%) - 6 meses	56±4	53±5	0,445
SPV	475 ±1120	424 ±1500	0,913
TVNS	1	1	0,99
Eventos adversos major	0	1	0,78
Mortalidade	0	1	0,78

FEVE – fração de ejeção do ventrículo esquerdo. SPV – sístoles prematuras ventriculares. TVNS – taquicardia ventricular não sustida.

Como já referido, estes estudos iniciais foram alvo de críticas quanto à rápida transição *bench-to-bedside*. No entanto, dos méritos que é justo atribuir-lhes, fazem parte a contribuição para o despertar do interesse da comunidade médica para o tema da Terapia Celular e a revelação de questões pertinentes para o seu desenvolvimento. Estas questões foram abordadas numa segunda geração de estudos multicêntricos e randomizados, que exploraram estratégias diferentes e avaliaram novos parâmetros (Tabela 5).

**Tabela 5 – Segunda geração de ensaios clínicos utilizando células estaminais no contexto de EAM.**↓ – Diminuição; ↑ – Aumento; Auto – Autólogo; CMN-Células Mononucleares; CMNMO – Células Mononucleares derivadas da Medula Óssea; CMO – Células derivadas da Medula Óssea; c – com grupo controlo; Eco – Ecocardiografia; IC – Injeção Intracoronária; IM – Injeção Intramiocárdica; AngVE – Angiografia do Ventrículo Esquerdo; FEVE – Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo; EAM – Enfarte Agudo do Miocárdio; RM – Ressonância Magnética; ICP –Intervenção Coronária Percutânea; r – randomizado; SP- Sangue Periférico; SPECT – Tomografia Computorizada por Emissão de Fotão Único; trat. – tratado.

Estu	Desenho	Placebo	No. Doentes trat./contr.	Tipo de Células	No. Células Injetadas	Via Entrega	Dias após EAM ou ICP	Método de Imagem	Follow-up (meses)	Resultados com Significado Estatístico (em comparação com o grupo controlo)
<b>FINCELL (2008, II)</b> <sup>247</sup>	r, c	Sim	40/40	Auto CMNMO	40.2 ± 20 x 10 <sup>7</sup>	IC	2-6	Eco, AngVE,	6	↑ FEVE
<b>REGENT (2009, I)</b> <sup>248</sup>	r, c	Não	80/80/40 contr.	Auto CMNMO / CD34+CXCR4-	17.8 x 10 <sup>7</sup> / 1.9 x 10 <sup>6</sup>	IC	3-12	RM, AngVE	6	↑ FEVE (apenas nos doentes com FEVE≤37%)
<b>MYSTAR (2009, II)</b> <sup>251</sup>	r	Não	30/30	Auto CMNMO	150 x 10 <sup>7</sup>	IC e IM	21-42 / 90-120	Eco, SPECT	3	↑ FEVE; ↓ Dimensão Enfarte
<b>HEBE (2011, II)</b> <sup>249</sup>	r, c	Não	69/66/65 contr.	Auto CMNMO / SP-CMN	29.6 ± 16 x 10 <sup>7</sup> / 28.7 ± 14 x 10 <sup>7</sup>	IC	4-7	RM	4	Sem diferenças
<b>LATE-TIME (2011, II)</b> <sup>252</sup>	r, c	Sim	59/29	Auto CMNMO	15 x 10 <sup>7</sup>	IC	14-21	RM	6	Sem diferenças
<b>TIME (2012, II)</b> <sup>254</sup>	r, c	Sim	43/36/41 contr.	Auto CMNMO	15 x 10 <sup>7</sup>	IC	3 / 7	RM	6	Sem diferenças
<b>SWISS-AMI (2013, II)</b> <sup>253</sup>	r, c	Não	66/67/67 contr.	Auto CMNMO	16 x 10 <sup>7</sup> / 14 x 10 <sup>7</sup>	IC	5-7 / 21-28	RM	4	Sem diferenças

O estudo FINCELL avaliou doentes com EAM tratados com fibrinólise, seguida de intervenção coronária percutânea <sup>247</sup>. A injeção intracoronária de CMNMO revelou-se segura e associou-se a uma ligeira melhoria da FEVE, avaliada por ecocardiografia ( $4,0 \pm 11,2\%$  vs.  $-1,4 \pm 10,2\%$ ,  $p = 0,03$ ). Neste estudo foram também avaliados o perfil disrítmico por Holter e a reestenose intra-stent por ecografia intracoronária, não tendo havido diferenças significativas nos vários parâmetros avaliados, assim como na evolução clínica aos 6 meses.

No estudo REGENT, 200 doentes com EAM e função sistólica ventricular esquerda comprometida ( $FEVE \leq 40\%$ ), foram aleatoriamente divididos em três grupos: um que recebeu uma infusão intracoronária de células selecionadas da medula óssea (CD34+ CXCR4-); outro em que foram administradas CMNMO; e um grupo controlo sem placebo <sup>248</sup>. Havia a expectativa que os marcadores CD34 e CXCR4 permitissem isolar uma subpopulação de células da medula óssea com maior potencial de regeneração cardíaca, pois observou-se que estas são rapidamente mobilizadas para a circulação periférica após necrose do músculo cardíaco, e sabe-se que também expressam marcadores específicos da linhagem cardíaca e endotelial. No entanto, não houve diferenças com significado entre os três grupos quanto à FEVE (avaliada por ventriculografia e ressonância magnética) e à evolução clínica dos doentes aos 6 meses. Porém, numa avaliação pré-especificada nos doentes com maior compromisso da função sistólica do ventrículo esquerdo, com FEVE inferior à média de 37%, observou-se uma melhoria significativa desta nos dois grupos tratados com células, o que não se verificou no grupo controlo. Quanto aos eventos adversos relacionados com o tratamento, apenas se registou um doente com uma fistula arteriovenosa femoral, relacionada com o cateterismo para entrega das células e que foi resolvida cirurgicamente. Uma das limitações deste estudo, e que pode ter influenciado os seus resultados, é o elevado número de abandono dos doentes durante o seguimento. A avaliação imagiológica da FEVE foi realizada em pouco mais de metade da população,



o que compromete o poder estatístico da análise efetuada e poderá ter subvalorizado a diferença absoluta de 3% observada nos dois grupos recetores de células.

O estudo HEBE, também com 200 doentes com função sistólica do ventrículo esquerdo comprometida após EAM, (FEVE média de 40-45%), comparou o efeito da injeção intracoronária de CMNMO, com a injeção intracoronária de células mononucleares obtidas do sangue periférico e com um grupo controlo não tratado com células <sup>249</sup>. Não houve diferenças significativas na função ventricular esquerda, global e regional, avaliada por ressonância magnética e na evolução clínica aos 4 meses. Num subestudo que incluiu 60 doentes, foram avaliados por Doppler a reserva de fluxo de coronário (RFC) e o índice de resistência microvascular hiperémica (RMh) <sup>250</sup>. Não se observaram nestes doentes diferenças que suportassem qualquer efeito na microcirculação ou na melhoria da neovascularização com a terapia celular.

Combinando duas formas de entrega das células, a transendocárdica com a intracoronária, o estudo MYSTAR avaliou o transplante de CMNMO às 3-6 semanas, com o transplante mais tardio, aos 3-4 meses de evolução do EAM <sup>251</sup>. Os 60 doentes incluídos receberam a maior quantidade de células publicadas num estudo até à data. Em ambas as estratégias, precoce e tardia, observou-se uma melhoria das dimensões de enfarte e na FEVE, mas estes resultados têm de ser interpretados com cautela na ausência de um grupo controlo. Além disso, os dois estudos descritos a seguir, mais recentes e controlados, também exploraram a entrega de células numa fase mais tardia após o EAM e não confirmaram as melhorias observadas.

O LateTIME foi realizado pela organização americana - The Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTRN) – tendo randomizado 87 doentes para explorar o efeito do transplante de CMNMO efetuado às 3 semanas após o EAM <sup>252</sup>. O SWISS-AMI por sua vez comparou, em 200 doentes com EAM, uma estratégia de entrega das células precoce (4 a 7 dias) com uma mais tardia (3 a 4 semanas) <sup>253</sup>. Em ambos os estudos não houve diferenças

com significado entre os vários grupos quanto à FEVE, contractilidade regional e dimensões de enfarte avaliados por ressonância magnética.

Na procura do melhor momento para o transplante celular é de referir também o estudo TIME, da CCTRN, que se focou na fase aguda de EAM, durante a instalação da resposta inflamatória e reparadora em evolução <sup>254</sup>. Os autores compararam a entrega ao 3º dia com a efetuada ao 7º dia. Novamente as duas estratégias tiveram um efeito neutro na função ventricular esquerda, global e regional, e na evolução clínica quando comparadas com o grupo controlo tratado com placebo.

A controvérsia também está presente nas metanálises que incluíram estes doentes com EAM e tratados com transplante autólogo de células da medula óssea por via intracoronária. As primeiras realizadas mostraram uma melhoria moderada da FEVE de 2% a 4%, que perdurou no tempo, e uma redução das dimensões do enfarte <sup>255,256</sup>. Destaca-se a realizada pela Cochrane Collaboration, com 33 estudos e 1765 doentes, e que mostrou um aumento significativo da FEVE (3 a 4 %) e uma redução das dimensões de enfarte com a Terapia Celular. Uma das metanálises iniciais concluiu existir mesmo uma redução significativa da ocorrência de eventos adversos *major* e da mortalidade total, embora também incluía estudos realizados no contexto de doença isquémica crónica <sup>257</sup>. No entanto, a avaliação mais recente feita por Jeevanantham *et al.*, com 22 estudos randomizados e controlados, que incluíram 1513 doentes dos quais 875 tratados, mostrou um aumento de apenas 2% na FEVE com a administração de células e, mais importante, este efeito desaparece por completo se avaliados apenas os estudos que utilizaram a ressonância magnética <sup>258</sup>. Esta análise também não revelou nenhum efeito na evolução clínica, embora os autores enfatizem que o seguimento de 6 meses realizados na maioria dos estudos possa ser insuficiente para uma conclusão clara. Outros autores destacam a existência de importantes vieses, contradições e discrepâncias nos desenhos dos ensaios clínicos, na sua metodologia e na apresentação dos seus resultados, podendo ser esta a fonte da disparidade dos resultados e uma matéria de

reflexão para uma melhor investigação nesta área<sup>259–262</sup>.

Embora os resultados desta segunda geração de estudos não alimentem o otimismo inicial, o interesse no potencial terapêutico das células de medula óssea para o tratamento do EAM mantém-se, motivado sobretudo pela consistência dos resultados do REPAIR AMI. Um estudo fase III, Bone Acute Myocardial Infarction (BAMI, NCT01569178), liderado por Andreas Zheier, o investigador principal do REPAIR AMI, pretende incluir 3000 doentes, e está atualmente a decorrer em vários centros europeus. Os resultados são esperados para 2017-18, e podem clarificar de forma definitiva as capacidades terapêuticas desta estratégia e o seu futuro.

### 1.5.2.2 Células estaminais mesenquimais

A investigação clínica com CEM também começou no contexto de EAM. Em 2003 Chen *et al.* apresentaram um estudo realizado na China, randomizado e controlado com placebo, que incluiu 60 doentes<sup>263</sup>. As células foram colhidas da medula óssea 8 dias após o evento agudo e foram cultivadas durante 10 dias. Foram administradas em média  $48 \text{ a } 60 \times 10^9$  células por via intracoronária, com a técnica habitual de *stop flow*. Vários parâmetros avaliados por tomografia de emissão de positrões, relacionados com a função ventricular esquerda ou com a contractilidade regional, apresentaram uma melhoria aos 3 meses com o transplante celular, que se manteve na reavaliação efetuada aos 6 meses. A velocidade do movimento da parede ventricular relacionada com o enfarte aumentou significativamente no grupo tratado, o que não aconteceu no grupo controlo. A FEVE aumentou de forma significativa de  $49 \pm 9\%$  para  $67 \pm 11\%$  e foi superior aos  $53 \pm 18\%$  do grupo controlo ( $p=0,01$ ). Não houve efeitos adversos relacionados com a injeção intracoronária das células, e durante o seguimento de 6 meses não houve eventos fatais ou disritmias cardíacas na avaliação por Holter.

Seguiram-se dois pequenos estudos não randomizados que também

concluíram pela segurança e benefício da injeção intracoronária das CEM. Um estudo Grego, publicado em 2005, avaliou os efeitos da injeção de  $2-4 \times 10^6$  de células em 11 doentes, metade com enfarte com mais de um mês de evolução <sup>264</sup>. Não houve eventos adversos relacionados com a entrega das células e, comparando com o grupo controlo de doentes emparelhados por género e idade, observou-se uma melhoria da contractilidade regional e da função ventricular avaliadas por ecocardiograma e SPECT. Outro trabalho realizado na China incluiu 16 doentes divididos para receberem CEM por injeção intracoronária na artéria culpada ou em outra artéria não relacionada com o enfarte <sup>265</sup>. Foram injetadas  $10-15 \times 10^6$  células, sem evidência de complicações e sem elevação dos marcadores cardíacos nas primeiras 24 horas. Observou-se também melhoria da função sistólica global e regional, mas estes resultados são de difícil valorização na ausência de um grupo controlo.

Outros estudos, de maior dimensão e mais recentes, levantaram questões quanto à segurança da injeção intracoronária de CEM. Gao *et al.* realizaram um estudo com 43 doentes randomizados para transplante autólogo de CEM e para um grupo controlo <sup>266</sup>. Um doente que recebeu  $0.84 \times 10^6$  pela técnica habitual de *stop flow* teve uma oclusão aguda da artéria durante o procedimento, sem resolução com a terapêutica instituída e que evoluiu para reenfarte do miocárdio. Além disso, neste estudo o tratamento com CEM não mostrou um efeito significativo na melhoria da viabilidade miocárdica e na função ventricular esquerda, quando comparados com o grupo controlo. Lee *et al.* randomizaram 69 doentes e reportaram dois enfartes do miocárdio relacionados com a injeção intracoronária de CEM, embora ambos fossem subclínicos e detetados por uma elevação significativa dos marcadores cardíacos de necrose miocárdica <sup>267</sup>. Os doentes receberam em média  $72 \pm 0,9 \times 10^6$  células e aos 6 meses apresentaram uma melhoria modesta mas significativa da FEVE quando comparada com o grupo controlo, avaliada ecocardiograficamente ( $1,9\% \pm 2,7\%$  e  $-0,5\% \pm 1,8\%$ ,  $p < 0,001$ ) e por SPECT ( $5,9\% \pm 8,5\%$  e  $1,6\% \pm 7\%$ ,  $p = 0,037$ ). Surpreendentemente as doses de células utilizadas nestes ensaios foram uma fração da utilizada por Chen *et*

*al.*, onde não há qualquer menção a eventos periprocedimento <sup>263</sup>.

Os estudos já referidos foram todos realizados com células autólogas entregues por via intracoronária. Hare *et al.* utilizaram uma estratégia diferente para realizar o primeiro ensaio randomizado, duplamente cego e controlado por placebo com CEM <sup>268</sup>. Neste estudo de fase I foi realizado um escalonamento da dose, podendo os 53 doentes receber 0,5, 1,6, ou  $5 \times 10^6$  CEM / kg, através de infusão em veia periférica. As células utilizadas eram de origem alogénica, provenientes de um dador e produzidas sob a forma de um produto terapêutico, estando este protegido pelas leis de propriedade intelectual e sendo possível a sua disponibilização generalizada à semelhança de um fármaco. Não foi utilizada imunossupressão e não houve eventos adversos relacionados com o estudo. Todos os doentes foram sujeitos a uma avaliação por tomografia axial do corpo, que excluiu a formação de tecido ectópico. Os doentes tratados tiveram menos disritmias ventriculares na monitorização em ambulatório por Holter, e uma tendência para uma maior recuperação da FEVE. A ocorrência de sístoles prematuras ventriculares foi o único parâmetro que mostrou relação com a dose de células administradas, tendo sido menos frequentes nas doses intermédia e elevada.

Todos os estudos clínicos referidos anteriormente utilizaram CEM provenientes da medula óssea. De forma mais restrita alguns investigadores optaram por CEM do tecido adiposo. Uma das suas vantagens é a possibilidade de serem colhidas em maior número, podendo obter-se 20 a  $40 \times 10^6$  células por 200 g de tecido adiposo, o que permite a sua utilização em doses com provável efeito biológico, sem necessidade de cultura e sem um atraso de semanas até à sua entrega. O APOLLO é um estudo fase I/IIa que avaliou a infusão intracoronária de  $20 \times 10^6$  células progenitoras do tecido adiposo autólogas, obtidas por lipoaspiração, em 14 doentes com EAM <sup>269</sup>. O procedimento revelou-se seguro, sem complicações associadas à lipoaspiração e à injeção intracoronária das células, realizados nas primeiras 24 horas após a angioplastia direta. Nos doentes tratados observou-se uma

redução significativa do defeito de perfusão do miocárdico e uma tendência para a melhoria da função ventricular em comparação com o grupo placebo. Os resultados deste estudo piloto motivaram a realização de um ensaio multicêntrico de fase IIb/III – o ADVANCE (NCT1216995), o qual se encontra a decorrer e pretende clarificar a segurança e eficácia desta estratégia, avaliando os seus efeitos em 216 doentes.

Mais recentemente, Gao *et al.* publicaram os resultados de um estudo randomizado e controlado com placebo com 116 doentes e utilizando pela primeira vez a injeção intracoronária de  $6 \times 10^6$  de células da geleia de Wharton <sup>270</sup>. Não houve eventos relacionados com a segurança destas células e os doentes tratados apresentaram um aumento significativo da FEVE aos 18 meses ( $7,8 \pm 0,9$  vs.  $2,8 \pm 1,2$ ,  $p=0,001$ ).

### 1.5.2.3 Células estaminais cardíacas

A investigação clínica com CEC é recente e iniciou-se com 3 pequenos estudos, um deles realizado em doentes com EAM. No CADUCEUS 25 doentes com disfunção ventricular esquerda após EAM recente foram randomizados para tratamento com cardioesferas ou para o grupo controlo <sup>271</sup>. As células foram colhidas dos próprios doentes através de biopsia endomiocárdica, expandidas e transplantadas por injeção intracoronária entre as 6 e as 12 semanas após o evento agudo.

No seguimento aos 6 e 12 meses não houve mortalidade, disritmias ventriculares com significado ou formação de tumores cardíacos em nenhum dos grupos <sup>272</sup>. Na avaliação por ressonância magnética não houve alterações significativas da FEVE ou dos volumes do ventrículo esquerdo, no entanto observou-se uma redução das dimensões da cicatriz de enfarte, bem como um aumento do miocárdio viável e da espessura miocárdica na região perienfarte. Os autores basearam-se na diminuição da cicatriz (definida pelo atraso no realce por gadolínio) e no aumento de miocárdio viável para

concluir pela existência de regeneração miocárdica. Esta extrapolação é criticada por vários investigadores pois a ressonância não permite diferenciar hiperplasia de hipertrofia miocárdica e o realce tardio pode estar associado a simples alterações da permeabilidade vascular. Mas as provas dadas, quanto à exequibilidade e segurança desta abordagem, constituem um marco na investigação e um bom início para estudos vindouros.

### **1.5.3 Investigação na cardiomiopatia isquémica crónica**

A doença coronária continua a ser a principal responsável pela disfunção ventricular esquerda e uma importante causa de insuficiência cardíaca. Por outro lado, a angina refratária, resistente à terapêutica médica e sem possibilidade de revascularização, também é comum e tem um impacto marcado na capacidade funcional e na qualidade de vida dos doentes. É pois natural que, logo na sua fase inicial, a investigação em Terapia Celular também se tenha focado nestes dois contextos clínicos.

#### **1.5.3.1 Células estaminais hematopoiéticas**

Explorando o putativo potencial angiogénico das CEH, em particular das CD34<sup>+</sup>, vários investigadores utilizaram o seu transplante para estimular a angiogénese local e reduzir a isquémia cardíaca nos doentes com angina. Estudos pioneiros, não controlados, concordaram quanto à exequibilidade e segurança desta estratégia terapêutica e mostraram uma melhoria na redução dos sintomas de angina, na tolerância ao esforço e na perfusão miocárdica<sup>273–276</sup>. Estes estudos têm em comum a injeção transendocárdica de CMNMO, utilizando os sistemas de mapeamento eletromecânico para as entregar nas regiões de isquémia, previamente identificadas por SPECT. Os pequenos ensaios clínicos controlados com placebo que se seguiram confirmaram estes resultados iniciais, embora na forma de tendências de melhoria ou de modestos benefícios clínicos<sup>277–279</sup>.

O ACT34-CMI é o maior ensaio neste contexto, com 167 doentes randomizados para um grupo placebo, um grupo de dose baixa ( $1 \times 10^5$  células / kg) e um grupo de dose alta ( $5 \times 10^5$  células / kg) de células CD34+ autólogas, mobilizadas para o sangue periférico pelo G-CSF e colhidas por leucaferese <sup>280</sup>. Os doentes tratados com células beneficiaram de uma redução da frequência dos episódios de angina e de uma melhoria da tolerância ao esforço mas, curiosamente, tal só teve significado estatístico no grupo de dose baixa. Alguns dos resultados puseram em causa a segurança desta estratégia: observou-se uma elevação dos marcadores cardíacos, consistente com o diagnóstico de enfarte do miocárdio em 4,6% dos doentes, o que pode estar relacionado com alterações hemodinâmicas motivadas pela administração do G-CSF e pelo procedimento de leucaferese realizados na presença de doença coronária grave; e em dois doentes houve perfuração cardíaca durante a injeção transendocárdica, um dos quais morreu após o insucesso da pericardiocentese. Utilizando uma metodologia semelhante o RENEW (NCT01508910) é um ensaio de fase III, em que está planeada a inclusão de 300 doentes e será o primeiro estudo com poder adequado para esclarecer o potencial terapêutico do transplante intramiocárdico de células CD34+ no tratamento da angina refratária <sup>281</sup>.

Wang *et al.* realizaram um estudo controlado com placebo com 112 doentes onde as células CD34+ foram obtidas por aspiração da medula óssea e a sua entrega efetuada por via intracoronária <sup>282</sup>. Contornaram desta forma os riscos da administração coadjuvante do G-CSF, da leucaferese e da injeção transendocárdica. Não houve eventos relacionados com a segurança do procedimento. No grupo dos doentes tratados houve uma redução significativa dos episódios semanais de angina em comparação com o grupo controlo ( $-15,6 \pm 4,0$  vs.  $-3 \pm 1,2$  aos 6 meses;  $p < 0,01$ ). Também houve uma melhoria significativa na utilização de nitroglicerina sublingual, na classe da *Canadian Cardiovascular Society* (CCS) e na perfusão miocárdica avaliada por SPECT.



Nos indivíduos em que a doença coronária evolui para a dilatação das cavidades cardíacas e para o compromisso da contractilidade ventricular, os objetivos vão além da redução da angina, pretendendo-se também um efeito positivo na remodelação ventricular, que culmine na restauração da função, na melhoria da sintomatologia de insuficiência cardíaca e no aumento da sobrevida. Uma das esperanças da Terapia Celular é que consiga cumprir estes objetivos e que se constitua como uma resposta terapêutica no contexto da cardiomiopatia isquêmica crônica, um campo carente de novas soluções.

Vários trabalhos avaliaram o efeito da injeção transepicárdica de CEH durante a revascularização cirúrgica em doentes com cardiomiopatia isquemia crônica <sup>283–285</sup>. Estes pequenos estudos piloto mostraram um benefício com a transplantação celular, sendo mais expressiva a melhoria da função ventricular esquerda dos doentes tratados com células do que a observada apenas com a revascularização coronária isolada. Contudo, a dimensão dos estudos, a heterogeneidade da população e a concorrência da própria revascularização tornam difícil a interpretação destes resultados.

Com uma metodologia menos agressiva, Perin *et al.* estudaram o efeito da injeção transendocárdica de CMNMO autólogas em 21 doentes com função ventricular esquerda comprometida, sintomas de insuficiência cardíaca e sem opção de revascularização miocárdica <sup>286</sup>. Neste ensaio aberto, não houve eventos relacionados com a segurança do procedimento e os doentes transplantados mostraram uma melhoria significativa da FEVE e uma redução do volume ventricular tele-sistólico, quando comparados aos 4 meses com o grupo controlo. Do mesmo investigador principal, o FOCUS-HF é um ensaio de fase I, que também avaliou a segurança e eficácia do transplante autólogo de CMNMO entregues por via transendocárdica numa população semelhante de 30 doentes <sup>287</sup>. No entanto, neste estudo não houve modificações significativas das dimensões do ventrículo esquerdo e dos parâmetros associados à sua função, mas apenas uma melhoria ligeira dos sintomas e um aumento da perfusão miocárdica, sem significado estatístico. Os autores

avaliaram igualmente a atividade das células utilizadas através de ensaios de clonogenicidade - *colony forming units* (CFU), o que revelou resultados interessantes. As células desta população de doentes apresentaram um compromisso marcado da sua atividade progenitora, com resultados de CFU entre 20 a 50% dos encontrados em indivíduos saudáveis, e com uma redução mais marcada nos mais idosos. Os doentes com menos de 60 anos, cujas células transplantadas tinham melhor função, apresentaram um aumento significativo do consumo de oxigénio (Vo2) máximo durante a prova de esforço cardiorespiratória, ao contrário dos doentes mais idosos em que esta não se alterou. Ambos os achados indiciam que a idade e o estado geral dos doentes pode influenciar os resultados do transplante autólogo de células, devido a um eventual compromisso das suas capacidades.

No estudo fase II que se seguiu em 2012, o FOCUS-CCTR, com 92 doentes randomizados para uma abordagem semelhante ou para placebo, o transplante de  $100 \times 10^6$  de CMNMO por via transendocárdica não conseguiu demonstrar um benefício significativo na modificação dos volumes ventriculares, do Vo2 máximo ou da perfusão miocárdica <sup>288</sup>. Foi observado um modesto aumento da FEVE de 2,7%, estatisticamente significativo e que se correlacionou com as percentagem de células CD34+ e CD133+ presentes no aspirado medular. Neste estudo não se notou nenhum efeito da idade nos resultados.

Pokushalov *et al.* também utilizaram a transplantação de CEH por via transendocárdica num estudo controlado, sem placebo, com 109 doentes com insuficiência cardíaca de etiologia isquémica <sup>289</sup>. Apesar de terem utilizado cerca de metade da dose de células do estudo FOCUS-CCTR, ao contrário deste os doentes transplantados apresentaram um expressivo benefício clínico. Houve uma modificação significativa da classe CCS ( $3,1 \pm 0,4$  para  $1,6 \pm 0,4$  após 12 meses;  $p=0,001$ ) e da classe funcional NYHA ( $3,3 \pm 0,2$  para  $2,5 \pm 0,1$  após 12 meses;  $p=0,006$ ). A FEVE aumentou significativamente ( $27,8 \pm 3,4\%$  para  $32,3 \pm 4,1\%$ ;  $p=0,04$ ), o que não aconteceu no grupo controlo. O benefício da Terapia Celular observou-se

inclusive na mortalidade aos 12 meses (10,9% vs. 38,9%;  $p=0,0007$ ). Por outro lado, num estudo controlado com placebo publicado mais recentemente, o TACT-HFT, com 65 doentes e que incluiu também um grupo tratado com CEM, não houve alterações significativas dos vários parâmetros clínicos avaliados no grupo tratado com CEH <sup>290</sup>.

A via intracoronária também foi explorada no contexto da cardiomiopatia isquémica crónica. Após as conclusões promissoras do estudo piloto IACT <sup>291</sup>, Strauer *et al.* apresentaram os resultados aos 5 anos do estudo STAR-Heart, um ensaio não randomizado que comparou 191 doentes tratados com CMNMO entregues por via intracoronária, com 200 doentes emparelhados pela FEVE <sup>292</sup>. O transplante celular (média de  $66 \pm 33 \times 10^6$  células) associou-se a uma melhoria significativa da FEVE, da qualidade de vida e da sobrevivência a longo prazo, com uma mortalidade de 0,75% / ano dos doentes tratados e de 3,68% / ano no grupo controlo ( $p=0,01$ ). No estudo TOPCARE-CHD, do grupo de Andreas Zeiher, 75 doentes foram randomizados para um grupo controlo e para dois regimes terapêuticos, um com transplante intracoronário de CMNMO e outro com transplante de células progenitoras obtidas do sangue periférico e cultivadas durante 3 dias, com *cross-over* destes dois grupos numa segunda fase <sup>293</sup>. Aos 3 meses, os doentes tratados com CMNMO tiveram um aumento significativo da FEVE avaliada por ressonância magnética, em comparação com os outros dois grupos. A este estudo seguiu-se o registo TOPCARE-CHD, com 121 doentes tratados com injeção intracoronária CMNMO pelo mesmo grupo de investigadores <sup>294</sup>. Uma avaliação desta população mostrou uma redução significativa dos níveis séricos dos péptidos natriuréticos aos 3 meses após o transplante celular. Um outro resultado importante foi a existência de uma relação entre a mortalidade observada e o número e a função das células injetadas, sendo que os doentes com maior número de CFU apresentaram uma maior sobrevida após o transplante celular.

Duas metanálises recentes, com diferentes metodologias, incluíram estudos controlados com transplante de CEH em doentes com cardiomiopatia

isquêmica crônica. Kandala *et al.* avaliaram 519 doentes com insuficiência cardíaca e incluídos em ensaios com transplante por via intracoronária ou transendocárdica <sup>295</sup>. Os doentes tratados tiveram uma redução significativa dos volumes ventriculares e a FEVE aos 6 meses melhorou em média 4.5%, sendo que estes benefícios foram mais expressivos no grupo do transplante por via transendocárdica. No trabalho de Fisher *et al.* foram estudados 659 doentes com angina ou insuficiência cardíaca, sem opção de revascularização miocárdica <sup>296</sup>. Nestes doentes o transplante de CEH resultou numa melhoria significativa das queixas de angina e na FEVE. Mais importante, observou-se também uma redução da mortalidade nos doentes tratados com células (RR 0,33; 95% 0,17 - 0,65; p=0,001). Estes benefícios terapêuticos carecem e merecem confirmação por ensaios clínicos com poder estatístico adequado e seguimento a longo prazo.

### **1.5.3.2 Células estaminais do músculo esquelético**

As células estaminais do músculo esquelético foram das primeiras células a ser utilizadas em investigação clínica na área da Cardiologia, com os primeiros estudos a serem realizados no início dos anos 2000. Pelas características intrínsecas deste tipo de células a investigação focou-se na cardiomiopatia isquêmica crônica.

Primeiro, Pagani *et al.* avaliaram o destino de mioblastos esqueléticos autólogos transplantados em 4 doentes com insuficiência cardíaca, em estágio terminal e a aguardar transplante cardíaco <sup>297</sup>. A avaliação histológica dos corações explantados durante o transplante revelou a sobrevivência dos mioblastos e a sua diferenciação e organização em miofibrilhas.

Aproximadamente na mesma altura, Menasche *et al.* publicaram os resultados de um estudo não controlado com 10 doentes com cardiomiopatia isquêmica crônica grave e que receberam mioblastos esqueléticos, injetados nas regiões de cicatriz miocárdica durante a cirurgia de revascularização <sup>298</sup>.

Estes doentes apresentaram uma melhoria da classe funcional e da FEVE, sendo possível que ambos resultassem sobretudo da terapêutica de revascularização. Em 4 doentes foram detetados episódios de taquicardia ventricular, o que alertou para uma importante questão de segurança, apesar de no seguimento a longo prazo os resultados serem favoráveis e apontarem para o controlo do risco disrítmico <sup>299</sup>. Num estudo piloto multicêntrico, não randomizado, Dip *et al.* trataram 24 doentes com uma metodologia semelhante <sup>300</sup>. A ocorrência de disritmias ventriculares significativas foi mais baixa (12%) e semelhante à esperada neste tipo de população. Houve ainda evidência de um aumento da viabilidade do tecido miocárdico nas zonas injetadas na avaliação por ressonância magnética e por tomografia de emissão de positrões.

O MAGIC foi o primeiro estudo de maior dimensão e controlado com placebo a avaliar o efeito da transplantação de mioblastos esqueléticos <sup>301</sup>. Foram randomizados 127 doentes com antecedentes de EAM, compromisso grave da função sistólica do ventrículo esquerdo e indicação para revascularização cirúrgica. Durante a cirurgia um grupo recebeu uma dose baixa de células ( $400 \times 10^6$ ), outro uma dose alta ( $800 \times 10^6$ ) e um terceiro foi injetado com placebo. Os doentes tratados com células tiveram o dobro da ocorrência de disritmias ventriculares, apesar de não haver diferenças com significado nos eventos adversos major aos 6 meses. Não houve diferenças significativas na evolução clínica e na FEVE, apenas uma modesta melhoria da remodelação ventricular, observada no grupo de dose mais elevada.

O estudo SEISMIC com 47 doentes, também randomizado e controlado, mostrou ser exequível e seguro o transplante por injeção percutânea transendocárdica de mioblastos esqueléticos <sup>302</sup>. Apesar de ter havido uma redução dos sintomas de insuficiência cardíaca no grupo tratado, a FEVE não mostrou nenhuma melhoria.

A investigação clínica com células estaminais do músculo esquelético, com o propósito de regeneração cardíaca, sofreu com o desânimo motivado pelos

resultados dos primeiros estudos e com o acumular de evidência sugerindo ausência de transdiferenciação e de integração eletromecânica destas células. Como já referido, atualmente a investigação pré-clínica está a investir na manipulação destas células de forma a ultrapassar estas limitações, aumentando a sua segurança e o seu potencial terapêutico<sup>132</sup>. Dependendo do sucesso desta abordagem, uma nova geração de estudos clínicos com células estaminais do músculo esquelético poderá surgir no futuro.

### 1.5.3.3 Células estaminais mesenquimais

Em 2006, Chen *et al.* publicaram os resultados de um estudo randomizado e controlado sem placebo <sup>303</sup>. O transplante de  $5 \times 10^6$  CEM autólogas foi realizado por via intracoronária e após ICP de uma oclusão crónica da descendente anterior. Não houve eventos relacionados com a segurança do procedimento, embora os autores descrevam que 3 doentes tiveram edema agudo do pulmão durante a intervenção, não especificando se associado a alguma alteração do fluxo coronário. Os doentes tratados tiveram uma melhoria significativa dos sintomas de insuficiência cardíaca, acompanhada de um aumento da FEVE ( $26 \pm 6\%$  para  $37 \pm 9\%$  aos 3 meses;  $p < 0,05$ ), o que não se verificou nos doentes apenas revascularizados. Dois outros pequenos estudos não controlados utilizaram CEM transplantadas por via transendocárdica ou transepicárdica. Ambos não tiveram eventos relacionados com a segurança, embora também não se tenha observado um benefício clínico significativo ou modificação da FEVE <sup>304,305</sup>.

Nos anos recentes, foram concretizados três estudos fase I/II em que foi utilizada a via transendocárdica para a entrega das células em doentes com cardiomiopatia isquémica crónica grave. No POSEIDON, 30 doentes foram randomizados para receber CEM autólogas ou alogénicas <sup>306</sup>. O TACT-HFT comparou 65 doentes randomizados num grupo com placebo, outro tratado com CMNMO e um terceiro que recebeu CEM <sup>290</sup>. Ambos demonstraram a segurança da intervenção e em particular não houve reações imunológicas

detetadas com a utilização de células alogénicas. No entanto, a FEVE não se alterou significativamente em nenhum dos grupos avaliados nestes estudos. Por outro lado, no recentemente apresentado ensaio MSC-HF, com 59 doentes, a terapêutica com CEM autólogas administradas por via transendocárdica associou-se a uma redução significativa aos 6 meses dos volumes ventriculares e a uma melhoria da FEVE, em comparação com o grupo placebo ( $5,5 \pm 3,8\%$  vs.  $-1,4 \pm 4,0\%$ ;  $p < 0,0001$ )<sup>307</sup>.

Também num estudo piloto recente, o PROMETHEUS, a avaliação meticulosa com ressonância magnética demonstrou uma redução da cicatriz miocárdica e uma melhoria da perfusão e da contratilidade dos segmentos injetados com CEM autólogas durante a cirurgia de revascularização de 6 doentes<sup>308</sup>.

O ensaio multicêntrico C-CURE explorou pela primeira vez a utilização de células modificadas, de forma a promover uma maior especificidade cardíaca da sua linhagem, o que se conseguiu expondo estas células a um conjunto de citocinas cardiogénicas durante a sua expansão<sup>309</sup>. Em 21 doentes foram injetadas CEM pré-tratadas e autólogas (média  $733 \times 10^6$ ) utilizando a via transendocárdica, os quais foram comparados com 15 doentes do grupo controlo sem placebo. O procedimento revelou-se seguro e não houve evidência de toxicidade das células. Por protocolo todos os doentes tinham um CDI, não tendo havido diferenças na ocorrência de disritmias ventriculares. A FEVE avaliada por ecocardiografia melhorou com a terapia celular, o que não se verificou no grupo controlo ( $27,5 \pm 1,0$  para  $34,5 \pm 1,1\%$  vs.  $27,8 \pm 2,0$  para  $28 \pm 1,8\%$ ;  $p < 0,0001$ ). Observou-se também uma melhoria do estágio funcional, com uma maior distância percorrida no teste da marcha dos 6 minutos ( $62 \pm 18$  vs.  $15 \pm 20$  m;  $p < 0,01$ ), assim como da qualidade de vida avaliada pelo *Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire*.

Mathisen *et al.* avaliaram o transplante de CEM no tratamento da angina refratária sem opção de revascularização. Neste estudo não controlado, 31

doentes foram tratados com injeção transendocárdica de CEM e apresentaram uma melhoria significativa dos sintomas e uma redução do número de hospitalizações durante o seguimento de 3 anos <sup>310</sup>.

O mesmo grupo do APOLLO avaliou o transplante de CEM provenientes do tecido adiposo em doentes com cardiomiopatia isquémica crónica, no estudo controlado com placebo – PRECISE, o qual avaliou o potencial terapêutico das células progenitoras derivadas do tecido adiposo, injetadas por via transendocárdica em 27 doentes sem opção de revascularização <sup>311</sup>. Houve um doente com derrame pericárdico e outro com enfarte sem elevação de ST durante a injeção das células. Não se observaram alterações significativas dos volumes ventriculares ou da FEVE. No grupo de Terapia Celular houve um aumento da massa ventricular avaliada por ressonância, o que não se verificou no grupo placebo. Os autores concluíram pela segurança da estratégia e por uma tendência para benefício clínico que merece ser explorada.

### **1.5.3.4 Células estaminais cardíacas**

O estudo SCIPPIO foi realizado em doentes com cardiomiopatia isquémica e indicação para revascularização cirúrgica após enfarte do miocárdio <sup>312</sup>. CEC com expressão do marcador de superfície c-kit foram obtidas do apêndice auricular esquerdo, removido durante a cirurgia. Em 16 doentes as células foram entregues por via intracoronária e outros 7 doentes constituíram o grupo controlo. Nos resultados publicados em 2011, não houve mortalidade ou eventos adversos major durante o seguimento. No grupo tratado houve evidência de redução das dimensões de enfarte e uma melhoria significativa de 12% da FEVE aos 12 meses, em oposição às do grupo controlo que não se alteraram. Este estudo foi considerado um marco na investigação em terapia celular e foi amplamente citado nos anos seguintes. Infelizmente, já em 2014 foi divulgado que entidades responsáveis das instituições onde o estudo foi realizado, a Harvard Medical School e o Brigham and Women's



Hospital, põem em causa a integridade dos dados apresentados <sup>313</sup>. Um processo de averiguação está em curso, podendo culminar na retratação do artigo.

O ALCADIA é um estudo preliminar apenas com 5 doentes com cardiomiopatia isquémica e sem grupo controlo <sup>314</sup>. Os autores utilizaram uma estratégia de terapia celular híbrida, na qual CEC obtidas por biopsia endomiocárdica foram injetadas durante a cirurgia de revascularização. No mesmo procedimento foi implantada no epicárdio uma formulação de libertação controlada de fator de crescimento do fibroblasto, citocina que se crê aumentar a sobrevivência das células. Não houve eventos relacionados com a segurança e a FEVE avaliada por ressonância aumentou 12%. No entanto, o reduzido número de doentes incluídos, a ausência de um grupo controlo e a concomitância do processo de revascularização não permitem qualquer conclusão sobre a eficácia desta estratégia.

### **1.5.4 Investigação na cardiomiopatia dilatada**

A investigação clínica com doentes com disfunção sistólica do ventrículo esquerdo e sem doença coronária é escassa. Existem algumas dificuldades particulares neste contexto. Em muitos doentes a etiologia é indefinida, o que aumenta a heterogeneidade da população em estudo. Por outro lado, ao contrário da doença adquirida, na cardiomiopatia dilatada não isquémica podem concorrer causas genéticas, que ao estarem presentes nas células do próprio poderão limitar a eficácia da sua utilização autóloga.

#### **1.5.4.1 Células estaminais hematopoiéticas**

A investigação clínica ainda está limitada a alguns pequenos estudos que utilizaram o transplante por via intracoronária de CEH autólogas. O ABCD, com 44 doentes, foi o primeiro a ser apresentado em 2006. A injeção intracoronária foi associada à provocação de estase venosa, com um balão

insuflado no seio coronário, com o objetivo de aumentar a passagem de células para o tecido cardíaco <sup>315</sup>. Os autores concluíram pela segurança e exequibilidade do procedimento e os doentes tratados apresentaram uma melhoria da classe funcional e um aumento da FEVE de 5,4% ( $20 \pm 7,4\%$  para  $25 \pm 12\%$ ;  $p < 0,05$ ). Também foram interessantes os resultados da avaliação histológica das peças obtidas por biópsia endomiocárdica aos 3 meses, os quais não revelaram a presença de CEH ou de cardiomiócitos imaturos.

No TOPCARE-DCM foram incluídos 33 doentes, que receberam sem complicações  $259 \pm 135 \times 10^6$  células CMNMO com a técnica de *stop flow* <sup>316</sup>. Nestes doentes observou-se uma ligeira, mas significativa, redução do péptido natriurético cerebral (BNP) ( $1610 \pm 994$  para  $1473 \pm 1147$  pg/mL;  $p = 0,038$ ) e um aumento médio da FEVE de 13% ( $p = 0,001$ ). Foi também realizado o estudo invasivo do fluxo coronário e da microcirculação cardíaca, através de Doppler intracoronário, com o intuito de detetar alterações compatíveis com angiogénese e aumento da capilaridade. Não houve, no entanto, modificações com significado dos vários parâmetros hemodinâmicos avaliados.

Bocchi *et al.* combinaram num pequeno estudo controlado a injeção intracoronária de CEH com a administração de G-CSF para mobilização periférica de células progenitoras. Esta abordagem associou-se também a uma melhoria funcional e da FEVE quando comparados com os do grupo controlo <sup>317</sup>.

Num primeiro estudo de Vrtovec *et al.* 55 doentes com disfunção sistólica grave do ventrículo esquerdo foram randomizados para injeção intracoronária de células CD34+ (obtidas do sangue periférico após mobilização com G-CSF) ou placebo <sup>318</sup>. A terapia celular associou-se a uma melhoria significativa da tolerância ao esforço e da FEVE ( $25,5 \pm 7,5\%$  para  $30,1 \pm 6,7\%$ ;  $p = 0,03$ ), sendo que os níveis de NT-Pro BNP foram reduzidos para cerca de metade ( $2069 \pm 1996$  pg/mL para  $1037 \pm 950$  pg/mL;  $p = 0,01$ ). A

mortalidade a um ano ou a necessidade de transplante cardíaco foi menor no grupo tratado (5% vs. 30%;  $p=0,03$ ). Os mesmos autores publicaram posteriormente os resultados do seguimento aos 5 anos desta população, entretanto expandida para 110 doentes, mostrando a persistência destes benefícios, inclusive na mortalidade total (14% vs. 35%;  $p=0,03$ )<sup>319</sup>.

### 1.5.4.3 Células estaminais mesenquimais

Os dados clínicos sobre a utilização de CEM na cardiomiopatia dilatada são ainda mais escassos. Em 2006 Wang *et al.* publicaram a primeira experiência de transplante de CEM, em 24 doentes randomizados para infusão intracoronária de células ou placebo<sup>320</sup>. Não houve eventos adversos relacionados com o procedimento, nem durante o seguimento de 6 meses. Os doentes transplantados tiveram uma melhoria modesta da tolerância ao esforço e os níveis de BNP foram inferiores aos do grupo controlo, apesar de terem aumentado nos dois grupos. Os volumes ventriculares e a FEVE mantiveram-se inalterados.

Num outro estudo proveniente da China, 43 doentes foram randomizados para receber por via intracoronária CEM ( $490 \pm 170 \times 10^6$ ), CEH ( $510 \pm 200 \times 10^6$ ) e placebo<sup>321</sup>. Aos 3 meses, foi observado um aumento da FEVE nos dois grupos tratados com células, embora apenas no grupo com CEM a diferença tenha sido significativa em comparação com o grupo controlo. Não houve diferenças na ocorrência de eventos adversos entre os três grupos.

Do grupo de Hare, o estudo POSEIDON randomizou 31 doentes com cardiomiopatia grave (FEVE média de 28%) para receber por via transendocárdica 3 doses de CEM ( $20 \times 10^6$ ,  $100 \times 10^6$  ou  $200 \times 10^6$ ), sendo que numa segunda fase, cada grupo foi aleatoriamente dividido para receber células autólogas ou alogénicas<sup>306</sup>. Mais uma vez o transplante alogénico não se associou a reações de autoimunidade, e também não houve diferenças com significado quanto à ocorrência de disritmias. O transplante autólogo e alogénico associou-se a uma melhoria do teste da marcha dos 6

minutos realizado aos 12 meses, sem diferenças entre os grupos, e a uma redução de cerca de um terço da cicatriz miocárdica, mas não houve alterações significativas da FEVE. Apenas no grupo alogénico houve uma redução significativa do volume ventricular telediastólico. Curiosamente, as alterações da função e dimensão ventricular tiveram uma relação inversa com a dose, sendo mais expressivas nas doses mais baixas.

### **1.5.5 Considerações finais e um futuro com muitas questões**

Após mais de uma década de investigação clínica, e tendo em conta os resultados dos principais estudos já referidos, é ainda difícil ter atualmente uma perspetiva clara sobre quando e como a Terapia Celular vai fazer parte do arsenal terapêutico da Cardiologia.

Existem algumas conclusões que os dados acumulados tornam possíveis e que devem fazer parte de uma reflexão sobre o tema:

a) não houve felizmente complicações significativas nas várias estratégias avaliadas, e a segurança e exequibilidade foi a regra na maior parte dos estudos. Os receios de formação do tecido ectópico, de neoplasias e de reações imunológicas não se confirmaram;

b) apesar da heterogeneidade dos estudos e de alguma discrepância nos resultados, assistiu-se a uma tendência para a observação de efeitos benéficos com a utilização de células no tratamento das formas mais prevalentes de doença cardíaca;

c) em nenhum estudo houve uma prova cabal de regeneração miocárdica, e até à data os eventuais benefícios são explicados por efeitos parácrinos das células transplantadas;

d) apesar de não se ter obtido a revolução que alguns previam, de forma otimista, estes estudos contribuíram para o aumento do interesse da comunidade médica sobre esta área científica, o qual tem motivado um maior investimento de recursos e o fomento de novos estudos;

e) a complexidade das várias variáveis biológicas envolvidas e o desconhecimento de muitos dos mecanismos moleculares e celulares com

protagonismo, são os principais entraves ao desenho de abordagens mais eficazes e que possam culminar numa verdadeira regeneração;

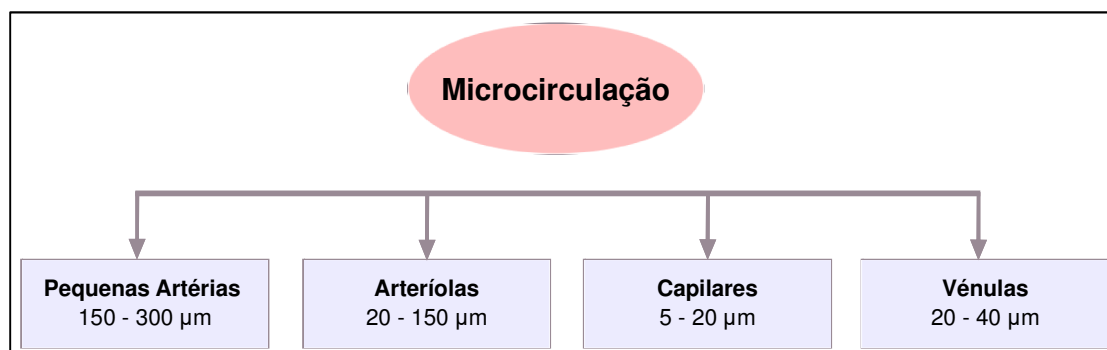
f) para cada um dos diferentes cenários clínicos continuamos sem saber qual o tipo celular adequado e a dose necessária, bem como qual o momento apropriado e melhor forma de entrega das células.

Para alcançar uma nova fase da Medicina, da qual as terapêuticas regenerativas façam parte, são necessários novos esforços que culminem em novas soluções. Abordagens inovadoras, a merecer avaliação no futuro, podem vir de estratégias biotecnológicas que já se perspetivam. A utilização de novas fontes de células com maior potencial regenerativo e a combinação de citocinas e de fatores de crescimento que potenciem as suas capacidades de fixação, sobrevivência e de transdiferenciação, estão já em avaliação. As técnicas de reprogramação genética poderão também facilitar a integração eletromecânica, bem como permitir a imunotolerância e ultrapassar os riscos de formação de tumores. Outras formas de otimização da Terapia Celular poderão passar pela terapia celular híbrida, com ação sinérgica na reparação vascular e regeneração miocárdica, ou pela utilização de materiais biocompatíveis de suporte para as células. Finalmente, a melhor compreensão dos processos de diferenciação celular, das interações moleculares entre as células transplantadas e os tecidos onde se alojam, e dos mecanismos parácrinos envolvidos, são fundamentais para o sucesso da investigação clínica futura.

## **2. Avaliação Invasiva Da Microcirculação Coronária**

A circulação coronária consiste em vasos condutores (artérias), vasos de distribuição (arteríolas), vasos de trocas (capilares) e vasos de receção (vénulas e veias). A microcirculação coronária é composta pelos vasos com diâmetro inferior a 300  $\mu\text{m}$  (Figura 4) <sup>322</sup>. No seu conjunto formam uma rede integrada de microvasos, que desempenha um papel na fisiologia da circulação cardíaca e cuja disfunção está presente em vários processos de

doença, como causa ou consequência. Na microcirculação reside 90% do volume de sangue do coração <sup>322</sup>.



**Figura 7 – Vasos que compõem a microcirculação coronária .**

### 2.1 Características da microcirculação coronária

É na microcirculação, sobretudo nas arteriolas com diâmetro inferior a 150 μm, que ocorre o controlo da pressão e do fluxo sanguíneo coronário, através da regulação da resistência vascular <sup>323</sup>. Este controlo tem o objetivo de garantir a manutenção do fluxo sanguíneo adequado às necessidades metabólicas do miocárdio e de manter a pressão capilar em níveis estáveis, permitindo as trocas de oxigénio e nutrientes, sem ocorrência de lesão vascular ou de edema dos tecidos.

Da resposta da microcirculação a vários estímulos resulta a denominada autoregulação coronária, que consiste na capacidade da circulação cardíaca em manter o fluxo sanguíneo relativamente constante, não obstante a existência de alterações marcadas da pressão de perfusão <sup>324</sup>. No coração normal o aumento da contractilidade, da frequência ou da tensão da parede miocárdica resultam num aumento das necessidades de oxigénio, as quais são compensadas pelo aumento do fluxo coronário. O balanço entre estímulos vasodilatadores e vasoconstritores das arteriolas é assim alterado de acordo com a pressão sistémica e as necessidades metabólicas do miocárdio.

Os mecanismos de regulação do fluxo coronário são de natureza variada e atuam em diferentes níveis da microcirculação <sup>325</sup>:

a) os neurohumorais, resultam da ação de neurotransmissores libertados pelo sistema nervoso vegetativo e atuam nas arteríolas maiores, com diâmetro de 140-300  $\mu\text{m}$ ;

b) os endoteliais, baseiam-se na libertação pelo endotélio de substâncias vasoativas como o óxido nítrico e algumas prostaglandinas, com efeito nas arteríolas com diâmetro de 80-150  $\mu\text{m}$ ;

c) os metabólicos, dependem da libertação local e sistémica de metabolitos, como a adenosina, e atuam nos vasos mais pequenos, com diâmetro de 25-100  $\mu\text{m}$ ;

d) os miogénicos, dependem da resposta do músculo liso da parede do vaso às alterações da pressão intraluminal, o que ocorre sobretudo nos vasos com 25-100  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

A disfunção da microcirculação está presente em vários processos patológicos, embora ainda não se compreenda completamente o seu significado, e pode consistir em alterações da resposta aos mecanismos de regulação ou da própria estrutura vascular, com diminuição do diâmetro e do número dos vasos. Nos doentes com aterosclerose, síndrome metabólica e insuficiência cardíaca, o compromisso da autoregulação coronária já foi demonstrado, o que estará provavelmente associado à disfunção endotelial presente <sup>326</sup>. No Síndrome Cardíaco X, que engloba os doentes com angina, com teste de isquémia positivo e ausência de doença nos vasos epicárdicos, tem sido sugerido o compromisso da resposta vasomotora da microcirculação <sup>327</sup>. No EAM a obstrução da microcirculação tem também um papel no mecanismo de lesão da isquémia-reperfusão e no fenómeno de *no reflow*, as grandes limitações das terapêuticas de reperfusão atuais <sup>328</sup>. Mesmo na ausência de doença coronária epicárdica o compromisso da microcirculação é um fator associado de forma independente à progressão para insuficiência e à morte cardíaca <sup>329,330</sup>. Alguns autores defendem mesmo que a microcirculação tem sido um alvo terapêutico negligenciado <sup>331</sup>.

O desconhecimento sobre o papel da microcirculação nas doenças cardíacas está relacionado sobretudo com a dificuldade na sua avaliação, que resulta por um lado da sua pequena dimensão e, por outro, da dificuldade adicional introduzida pela variabilidade do ciclo cardíaco. As técnicas laboratoriais complexas que permitiram o estudo da fisiologia coronária não são exequíveis na prática clínica, pelo que a sua translação não ocorreu. Nos últimos anos, a evolução das técnicas de imagem têm proporcionando avanços no conhecimento do estado da microcirculação na doença e a sua resposta às medidas terapêuticas. Também no Laboratório de Hemodinâmica tem sido possível avançar da avaliação do estado dos grandes vasos epicárdicos para a dimensão das arteríolas e capilares como veremos mais à frente.

### **2.2 Relevância da microcirculação coronária para a Terapia Celular**

A participação da microcirculação no processo de Terapia Celular ocorre de duas formas diferentes. Uma consiste no seu papel de micro-barreira para as células entregues por via intravascular, influenciando a migração das células para os tecidos ou a sua destruição no interior dos vasos obstruídos. A outra, passa por ser potencialmente beneficiária direta da ação terapêutica das células, podendo a formação de novos vasos influenciar a estrutura e função da rede microvascular regional ou global.

A migração para o coração das células entregues por via intravascular depende do reconhecimento e/ou interação com o endotélio dos microvasos, e da sua extravasão, passando através da parede dos capilares para os tecidos circundantes<sup>332</sup>. É provável que a migração celular dependa de uma relação complexa entre citocinas, moléculas de adesão, proteases e as forças de Starling. No entanto, os mecanismos envolvidos ao nível do coração ainda não estão esclarecidos, sendo apenas possível fazer algumas extrapolações do que já se conhece sobre a fixação das células



hematopoiéticas à medula óssea durante o transplante de medula, acrescidas de alguns contributos da escassa investigação dirigida ao coração <sup>333</sup>.

A própria lesão ou inflamação dos tecidos pode promover não só a mobilização, como também a extravasão das células, o que pode ser particularmente relevante no contexto de EAM. Está demonstrado que após uma agressão miocárdica existe um aumento da síntese do SDF-1 nas células endoteliais, o qual está ligado ao recrutamento de CEH em circulação, através da sua ligação ao recetor CXCR4 <sup>334</sup>. Um outro estudo procurou esclarecer as bases moleculares da fixação miocárdica das CEM, concluindo serem distintas das CEH e em parte dependentes da integrina  $\beta 1$  <sup>335</sup>.

No caso de ocorrer obstrução dos vasos pelas células administradas, além do risco de microenfartes que comprometam a segurança, não é conhecida a forma como poderá estar influenciada a extravasão das células para o tecido miocárdico. Num estudo interessante, Toma *et al.* avaliaram com microscopia intravital do músculo cremastérico do rato o destino de CEM após injeção intra-arterial <sup>225</sup>. Os autores descobriram que 92% das CEM ficaram retidas ao nível pré-capilar, tendo comprometido em 27% o fluxo sanguíneo regional. Apenas 14% das células conseguiram sobreviver neste ambiente de isquémia e extravasar para o tecido circundante. Estes resultados são favoráveis à hipótese de que a própria eficácia do transplante intra-arterial de CEM pode estar comprometida pela obstrução da microcirculação. Por outro lado, o contacto com as células e o endotélio capilar durante um determinado tempo deve ser necessário para que a interação molecular ocorra e não exista uma simples passagem das células para o sistema venoso. Com todas estas questões em aberto, a obtenção de informação sobre o estado da microcirculação durante a injeção das células poderá acrescentar dados relevantes ao sucesso e à segurança da Terapia Celular, em particular quando utilizada a via intracoronária.

O estudo da microcirculação também pode fornecer informação sobre os benefícios da terapia com células na promoção da angiogénese. Alguns

estudos clínicos já mencionados avaliaram a hipótese de existir a restauração da microcirculação aos 4 meses após a administração de células. Num subestudo com Doppler intracoronário que incluiu 58 doentes do estudo REPAIR AMI, observou-se uma melhoria significativa da reserva de fluxo coronário e uma diminuição da resistência de microcirculação nos doentes tratados <sup>336</sup>. Do mesmo grupo, um outro subestudo com Doppler intracoronário realizado em 40 doentes do TOPCARE-AMI, os resultados foram semelhantes, com a normalização do fluxo coronário e da resistência de microcirculação nos doentes tratados <sup>337</sup>. Por sua vez, os estudos HEBE e TOPCARE-DCM também incluíram a avaliação da microcirculação por Doppler intracoronário, não tendo havido diferenças nos parâmetros avaliados do fluxo coronário e da resistência da microcirculação <sup>250,316</sup>. A neoangiogénese resultante da terapia celular, com a formação de microvasos e a consequente melhoria da microcirculação, continua desta forma a ser controversa e a carecer de confirmação.

### 2.3 A avaliação da resistência microvascular

A avaliação funcional da circulação coronária durante a cateterização cardíaca faz hoje parte da atividade habitual do Laboratório de Hemodinâmica e Cardiologia de Intervenção, sendo possível determinar a pressão existente em vários níveis da circulação e o fluxo de sangue que perfunde os vasos num determinado momento.

Tal como está expresso na Lei Física de Ohm, a resistência é o resultado do gradiente de pressões a dividir pelo fluxo, sendo este a quantidade de sangue por unidade de tempo que passa por uma secção transversal de um vaso,  $R = \frac{DP}{Q}$  ( $R$  – *resistência*,  $DP$  – *diferença de pressões*,  $Q$  – *fluxo*). Num sentido mais lato, a resistência vascular é o obstáculo proporcionado por um vaso ao fluxo nele contido. A medida da resistência depende pois da intensidade do fluxo e da diferença de pressão ente as extremidades de um vaso e o seu valor não é direto mas apenas relativo.

A circulação coronária é influenciada por duas resistências fisiopatológicas: as motivadas pela presença de estenoses dos vasos epicárdicos; e as da disfunção microvascular <sup>338</sup>. A prática clínica está sobretudo focada na doença coronária epicárdica, pelo que é compreensível que os primeiros parâmetros a serem estudados tenham sido relacionados com esta.

O fluxo fracionado de reserva do miocárdio (FFR) é a razão da pressão média distal à estenose com a pressão média da aorta durante a vasodilatação máxima induzida farmacologicamente. O valor de FFR multiplicado por 100 é igual à percentagem de sangue que irriga aquela região do miocárdio em comparação com a que se verificaria se a coronária fosse normal. A determinação do FFR é hoje de grande auxílio na determinação do significado funcional das lesões coronárias, estando validada por vários estudos e a sua utilização encontra-se em franca expansão <sup>339,340</sup>.

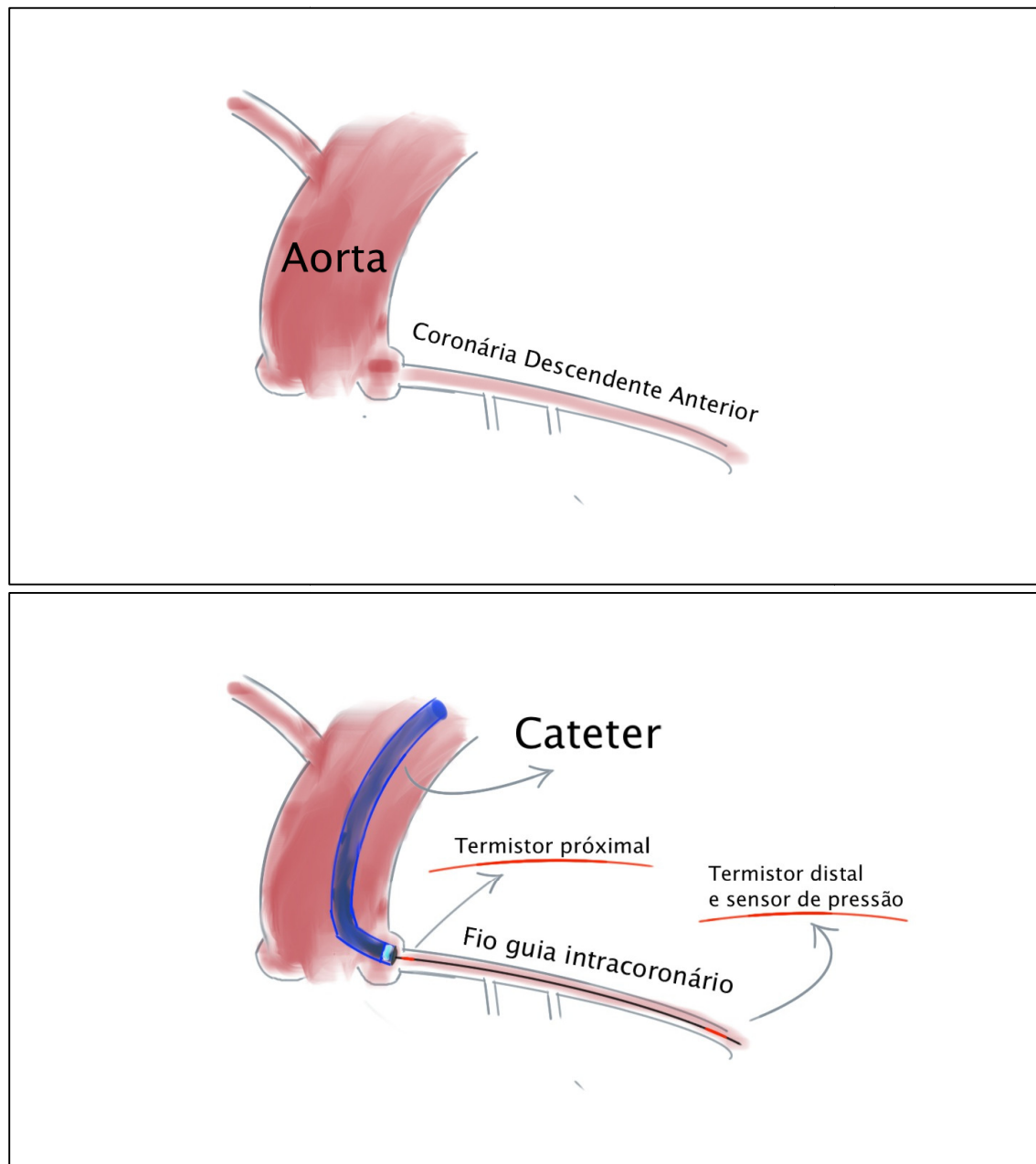
A reserva de fluxo coronário (RFC) é o aumento máximo do fluxo sanguíneo (durante fase de vasodilatação máxima ou de hiperémia) acima do que está presente em repouso. A sua avaliação requiere a determinação da velocidade do fluxo coronário, realizada por Doppler ou por termodiluição, embora também seja possível a utilização de índices semiquantitativos da perfusão coronária para obter uma razão equivalente <sup>341</sup>. A RFC tem a desvantagem de não ser independente das condições hemodinâmicas de base e de fornecer informação sobre o estado da circulação epicárdica e da microcirculação, não sendo possível diferenciá-las <sup>338,342</sup>. Estas são importantes limitações para a sua utilização no estudo da microcirculação.

A melhor forma de estudar a microcirculação consiste em avaliar a sua resistência. O estudo invasivo da resistência da microcirculação pode ser efetuado de forma global ou regional. Na primeira, o fluxo sanguíneo de todo o coração é determinado através da cateterização seletiva do seio coronário e da técnica de termodiluição. Para a avaliação regional é necessário a cateterização seletiva de uma das coronárias com fios intracoronários com

capacidade específicas – de Doppler ou de avaliação térmica (para termodiluição).

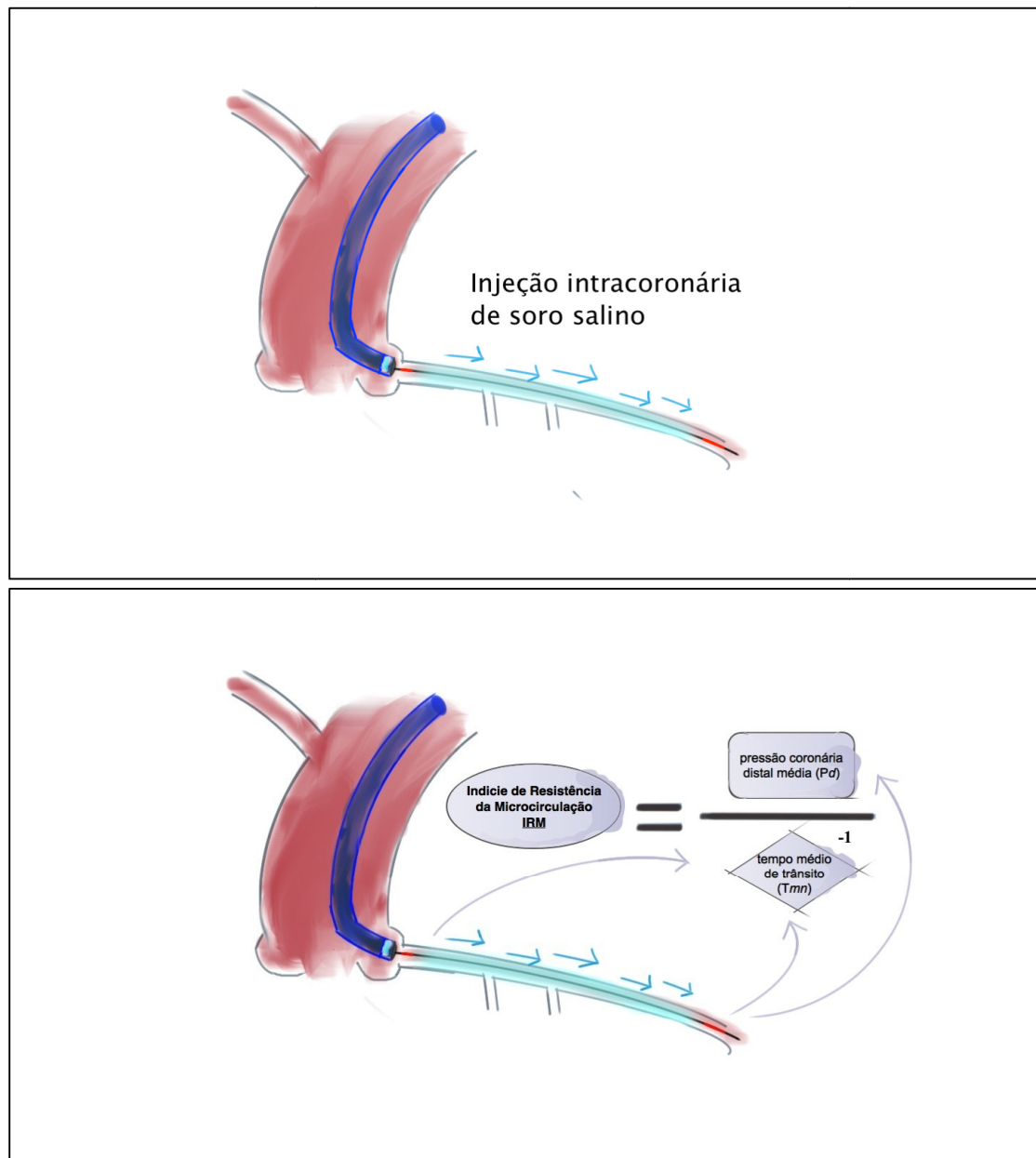
Com um fio específico de Doppler intracoronário mede-se a velocidade do fluxo coronário, sendo necessário também conhecer a área do vaso para a determinação do volume de sangue, o que pode ser conseguido por quantificação angiográfica ou ecografia intracoronária. A razão entre a pressão distal média, durante a fase de hiperémia, e a média da velocidade de pico distal é denominada de Resistência Microvascular hiperémica (RMh).

Com a técnica de termodiluição determina-se o índice de resistência da microcirculação (IRM), o qual foi já validado e ultrapassa as limitações da RFC (Figura 8). Além disso, o IRM baseia-se na tecnologia de fio guia de pressões, utilizada atualmente de forma corrente na prática clínica, ao contrário do Doppler intracoronário <sup>343</sup>. Este índice é avaliado durante uma fase de fluxo máximo e é definido pela pressão coronária distal média ( $P_d$ ) dividida pelo inverso do tempo médio de trânsito ( $T_{mn}$ ) durante a fase de hiperémia,  $IRM = \frac{P_d}{T_{mn}-1}$ . O tempo médio de trânsito é determinado por termodiluição (Figura 8). Uma injeção intracoronária de 3 ml de soro à temperatura ambiente através do cateter, provoca uma variação térmica, a qual é detetada pela parte proximal do fio guia de pressões (que funciona como termístor proximal). De seguida, o soro flui pela coronária até ao termístor distal onde novamente se assinala a mudança térmica. Medindo-se o tempo que o soro percorreu desde o sensor proximal ao distal, em várias injeções, temos o tempo médio de trânsito. O IRM é reprodutível e independente da frequência cardíaca, da pressão sanguínea e da contractilidade cardíaca <sup>344</sup>.



**Figura 8 - Ilustração da avaliação do Índice de Resistência da Microcirculação.**

**A - Aorta e artéria descendente anterior. B- Cateterização seletiva da coronária esquerda e fio guia no interior da descendente anterior.** A porção do guia à saída do cateter funciona como termístor proximal e o sensor de pressão distal é o termístor distal.



**Figura 8 (cont.) - Ilustração da avaliação do Índice de Resistência da Microcirculação. C - Injeção intracoronária de soro salino à temperatura ambiente. D- Determinação do índice.** A alteração da temperatura é detetada no termístor proximal e, após o soro percorrer a descendente anterior, é novamente detetada no termístor distal, medindo-se assim o tempo médio de trânsito (Tmn). A pressão coronária distal média (Pd) é avaliada pelo sensor de pressão, e a razão desse valor pelo inverso do Tmn é o Índice de Resistência da Microcirculação.

Um passo chave para a correta avaliação do IRM consiste na indução da hiperemia máxima, que é o resultado da vasodilatação generalizada da árvore coronária. Para a obtenção desta vasodilatação são utilizados fármacos vasodilatadores dos pequenos vasos, sendo a adenosina intravenosa e a papaverina intracoronária os mais eficazes<sup>345</sup>. Contudo, os estudos em animais têm utilizado doses diversas destes fármacos, não estando ainda definida qual a dose correta ou se existe um efeito de dose/tempo a ser considerado na interpretação dos seus resultados.

Um intervalo de referência para o IRM em indivíduos normais foi recentemente estabelecido entre 8.9 e 22.7 U, com um valor médio de 12.6 U<sup>346</sup>. Na presença de fatores de risco cardiovascular e na doença coronária estável o IRM reportado é superior, com um valor médio de cerca de 25 U<sup>344,347</sup>. No contexto de EAM, foi demonstrado que o valor limite de 32 U é predizente da recuperação miocárdica após o evento agudo<sup>348</sup>.

### 3. Modelo Animal Para Investigação Pré-Clínica

Desde cedo a investigação biomédica organizou-se em fases, sendo a etapa pré-clínica essencial para o desenvolvimento de novos tratamentos e para evolução do conhecimento sobre os sistemas fisiológicos que nos regem e sobre os mecanismos fisiopatológicos da doença.

A investigação animal garante uma maior segurança da investigação clínica, permite uma primeira exploração do *proof of concept* de uma determinada ação terapêutica e possibilita a avaliação de parâmetros biológicos com métodos não aplicáveis no ser humano. A análise dos dados fornecidos pela investigação animal está hoje incluída nos requisitos de aprovação de várias entidades regulatórias que lidam com investigação clínica e com a aprovação de medicamentos ou dispositivos médicos.

### 3.1 Translação dos estudos animais pré-clínicos

A investigação animal baseia-se na noção que os processos fisiológicos e fisiopatológicos, relevantes para a avaliação, são semelhantes aos presentes no ser humano. Este é um conceito simplista, tendo em conta a grande complexidade e variabilidade destes processos, intra e inter-espécies. A validação dos modelos animais utilizados, ou o conhecimento das suas limitações, é fundamental para garantir uma correta interpretação e extrapolação dos dados obtidos <sup>349</sup>.

A maioria dos estudos pré-clínicos realizados utilizam animais de pequeno porte (o rato e o ratinho são os mais comuns), sobretudo por questões éticas e de exequibilidade dos estudos, sendo estes de menor custo e com menores e mais simples necessidades logísticas <sup>350</sup>. Existem diferenças consideráveis entre a fisiologia e anatomia do coração do roedor e o humano. Os potenciais de ação dos cardiomiócitos do rato têm uma duração curta e sem *plateau*, sendo que a sua frequência cardíaca é cerca de 5 vezes superior e a relação força-frequência do coração é inversa, em comparação com a humana <sup>351</sup>. Apesar da frequência cardíaca mais elevada, o coração do rato bate cerca de  $700 \times 10^6$  vezes, nos seus 2 a 3 anos de vida, e o do humano contraí  $2500 \times 10^6$  vezes, ao longo da sua vida mais longa <sup>352</sup>. Ao contrário do humano, o coração do rato possui a fisiologia do torpor, um estado em que o metabolismo pode ser rápida e drasticamente reduzido <sup>352</sup>. Nestes evidentes contrastes, residem certamente diferenças biológicas a ter em conta na interpretação dos estudos com estes modelos e na sua extrapolação para o ser humano.

A simples discrepância na dimensão pode ser uma limitação importante na investigação de terapêuticas regenerativas. O coração do rato pesa cerca de 70 mg e o seu ventrículo esquerdo tem 1 mm de espessura, já no homem adulto o ventrículo esquerdo pesa cerca de 500 g e tem 1 cm de espessura



<sup>353</sup>. Desta forma, compreende-se que a tarefa de regenerar tecido miocárdico viável e com significado clínico, será muito mais exigente no ser humano.

Apesar de já existirem métodos de imagem e de cateterização do roedor que permitem a avaliação do coração e da sua função, estes são distintos dos utilizados na prática clínica no ser humano. Também está limitada a utilização das técnicas terapêuticas invasivas, endovasculares ou cirúrgicas, o que impossibilita a mimetização dos procedimentos clínicos em uso.

Do balanço entre as mais-valias e as desvantagens da investigação em animais de pequenas dimensões, resulta que seja considerado como fundamental um outro patamar de investigação com animais de maior porte, que se aproximem mais do ser humano em termos evolutivos e de dimensões. Os trabalhos com roedores permitem de forma mais expedita avaliar a sobrevivência e integração das células transplantadas, assim como a exploração dos efeitos biológicos provocados e os potenciais riscos associados, como a formação de tumores. As dificuldades consistem na sensibilidade da avaliação da função cardíaca, na exequibilidade de estudo de dose-efeito, bem como na impossibilidade de comparar diferentes formas de entrega das células.

### **3.2 Modelo animal de grande porte para investigação em Cardiologia**

A escolha do animal de grande porte mais adequado para investigação em Cardiologia depende da sua semelhança com o ser humano, da sua disponibilidade, da sua facilidade de manutenção em cativeiro e das questões éticas e de aceitação social associadas. Nos últimos anos, o porco surgiu como o animal que melhor concilia estes requisitos e é hoje o modelo mais usado em investigação ligada ao coração, substituído o cão, frequentemente utilizado há algumas décadas atrás <sup>354</sup>.

A circulação cardíaca do porco é a que se aproxima mais da humana, na anatomia coronária, tamanho, estrutura e distribuição dos vasos, sendo a sua dominância maioritariamente direita e a circulação colateral igualmente mínima <sup>355</sup>. O tecido de condução cardíaco também é muito semelhante e a própria razão entre o tamanho do coração e a superfície corporal são idênticas, se considerarmos os animais com cerca de 30 kg <sup>356,357</sup>. Também na perspectiva do seu metabolismo cardíaco o porco assemelha-se ao ser humano, dependendo sobretudo de ácidos gordos não esterificados para a produção de energia em condições de normalidade <sup>357</sup>.

As dificuldades em trabalhar com o modelo suíno passam pela sua elevada suscetibilidade para hipertermia maligna durante a indução anestésica, algo que experienciámos durante os trabalhos que conduziram a esta tese, pelo baixo limiar disrítmico durante a manipulação das coronárias e pelo seu rápido crescimento, se existir a necessidade de um seguimento prolongado dos animais. Algumas destas limitações foram ultrapassadas com o desenvolvimento do mini-porco, cuja utilização em investigação é cada vez mais frequente <sup>358</sup>.

Ao contrário dos animais de pequeno porte, os animais de maiores dimensões permitem a avaliação do número de células a transplantar, do volume e velocidade da sua administração e da melhor forma e local de entrega. A possibilidade de transportar as técnicas e a tecnologia de intervenção coronária para o laboratório permitem também uma aproximação à realidade clínica, impossível com animais de pequenas dimensões.

# Hipótese

---



### III. HIPÓTESE

---

O IRM permite pela primeira vez o estudo da microcirculação cardíaca, em tempo real e *in vivo*. A utilização da via intracoronária para transplantação cardíaca das CEM, de dimensão superior aos capilares, motiva receios pela possibilidade de obstrução da microcirculação.

No caso da avaliação do IRM permitir a deteção de alterações da microcirculação durante a intervenção de entrega das CEM será demonstrado pela primeira vez o valor desta técnica neste contexto.

Além de dar um contributo para a demonstração das alterações da microcirculação, a avaliação do IMR poderá no futuro ter um papel na aplicação clínica do transplante intracoronário destas células, podendo auxiliar no estabelecimento de limiares de segurança quanto ao número de células ou à sua velocidade de infusão.

Da mesma forma, existindo meios de produção otimizados para a obtenção de CEM de menores dimensões e com igual ou superior potencial terapêutico, o IRM poderá permitir a sua comparação em termos de segurança e eficácia.

Este trabalho pretende testar as seguintes hipóteses:

- a injeção intracoronária de CEM associa-se a uma obstrução da microcirculação, a qual se traduz num aumento imediato e mensurável do IRM;

- a avaliação da microcirculação com o IRM, pode ser útil no estudo de dose-efeito e na comparação de células com propriedades físicas diferentes;
- a injeção intracoronária de CEM associa-se a neoangiogénese e promove a restauração da microcirculação no contexto de EAM, a qual se traduz numa alteração positiva no IRM.

Para testar estas hipóteses o trabalho decorrerá em três fases com objetivos e métodos distintos.

# Objetivos

---





### **IV. OBJETIVOS**

---

#### **1. Primeira Fase**

##### **1.1 Objetivo principal**

A complexidade da investigação animal associada à da própria técnica de determinação do IRM aconselham uma necessária validação destes modelos, antes da utilização do seu potencial para o estudo da fisiopatologia da doença cardíaca ou para a avaliação dos efeitos de determinada terapêutica na microcirculação.

O objetivo principal é validar a técnica de determinação do IRM no nosso modelo animal de grande porte (suíno).

##### **1.2 Objetivos secundários**

Um passo chave para a correta avaliação do IRM consiste na indução da hiperemia máxima através da utilização de fármacos vasodilatadores. Contudo, os estudos em animais têm utilizado doses diversas destes fármacos, não estando ainda definida qual a correta ou se existe um efeito de dose a ser considerado na interpretação dos seus resultados. Também em relação ao IRM não está definida a duração do efeito da hiperémia, ou quando o seu resultado regressa ao estado basal, o que pode ser importante na avaliação dos efeitos imediatos de uma ação com potencial interferência na microcirculação.

Os dados obtidos com este estudo permitirão avaliar o número de elementos da amostra para os estudos subsequentes, avaliando a variância que se poderá esperar e a potência necessária do teste estatístico.

Desta forma, os objetivos secundários são:

- a) a comparação de duas doses de papaverina para indução de hiperemia máxima, 5 e 10 mg, quanto ao valor de IRM obtido e o estudo da sua evolução temporal;
- b) dimensionamento da amostra para a Segunda Fase.

## **2. Segunda Fase**

### **2.1 Objetivo principal**

Avaliar o efeito imediato no fluxo sanguíneo e na microcirculação coronária da injeção intracoronária de CEM num modelo animal suíno, através do estudo hemodinâmico invasivo com a determinação do IRM e da RFC.

### **2.2 Objetivos secundários**

Avaliar:

- a) os efeitos hemodinâmicos sistêmicos da injeção intracoronária de CEM;
- b) as alterações eletrocardiográficas, indiciadoras de isquemia ou de disritmias, motivados pela injeção intracoronária de CEM.

## **3. Terceira Fase**

### **3.1 Objetivo principal**

Comparar efeitos imediatos na microcirculação coronária com a determinação do IRM da administração intracoronária de CEM convencionais e CEM produzidas de forma inovadora num modelo animal suíno de EAM.

### 3.2 Objetivos secundários

Avaliar:

- a) as alterações induzidas pelo EAM no IRM e RFC;
- b) a dose-efeito da administração de CEM na circulação coronária;
- c) a eficácia e a sobrevivência da CEM administradas por via intracoronária no contexto de EAM
- d) os efeitos regenerativos das CEM, em particular na neoangiogénese miocárdica.



# Métodos

---



### V. MÉTODOS

---

#### 1. Primeira Fase

##### 1.1 Manipulação animal

Foram utilizados 8 suínos cruzados (machos Duroc X fêmeas F1 Large White X Landrace), com peso vivo entre 25-40 Kg ( $32 \pm 5$  Kg). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-estar Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa e autorizado pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária. Os animais foram tratados respeitando as normas de utilização humanitária e bem-estar (diretiva Europeia 2010 / 63 / EU, sobre proteção dos animais utilizados para fins científicos).

Todos os animais foram mantidos em jejum nas 12 horas que antecederam o procedimento. Como medicação pré-anestésica foram administrados a cada animal, por via intramuscular, 2 mg kg<sup>-1</sup> de azaperona (Stresnil®), 1 mg de atropina e, após um período de 15 minutos, 20 mg kg<sup>-1</sup> de cloridrato de quetamina (Imalgene 1000®). Já na sala de hemodinâmica, foi colocado um cateter venoso de 22G (Abbocath®) na veia marginal da orelha, através do qual se administraram 6 mg kg<sup>-1</sup> de tiopental sódico 5% (Tiopental BRAUN®). Depois da confirmação da perda do reflexo de deglutição procedeu-se à intubação orotraqueal, após o que o animal foi colocado em ventilação controlada com volume corrente de 10 ml kg<sup>-1</sup>. Para a manutenção da anestesia utilizou-se isoflurano a 2% (Isoflo®, Abbott Laboratories) em fluxo constante de O<sub>2</sub>. Os animais foram mantidos em infusão venosa contínua de solução salina 9% até ao final da intervenção e a sua temperatura assegurada com manta térmica.

Os animais utilizados neste estudo não foram sacrificados. Assim, durante o recobro de 24 horas foi feita analgesia com 2 mg kg<sup>-1</sup> p.v. de carprofeno

(Rimadyl, Pfizer) e antibioticoterapia com  $15\text{mg kg}^{-1}$  p.v. de amoxicilina (Clamoxyl L.A., Pfizer), não tendo os animais manifestado qualquer sinal de sofrimento.

### 1.2 Cateterização cardíaca, avaliação hemodinâmica e angiográfica

A via de acesso utilizada foi a artéria femoral direita, cateterizada com a técnica de Seldinger e colocando-se um introdutor 6 *French*. Após a obtenção do acesso arterial os animais foram anticoagulados com a administração de  $200\text{ U kg}^{-1}$  de heparina (Heparin Braun®). Os procedimentos relacionados com a cateterização cardíaca foram guiados por fluroscopia (Philips Medical Systems NL B.V.).

A pressão arterial na aorta e a pressão telediastólica do ventrículo esquerdo foram determinadas de início, com a utilização de um cateter *pigtail* (Cordis), após calibração e estabilização das curvas de pressão-tempo, utilizando-se um polígrafo GE Medical Systems.

A cateterização seletiva da coronária esquerda foi realizada com um cateter guia Amplatz esquerdo 0,75, 6 *French* (Cordis), seguida de uma angiografia de base com injeção prévia de 0,5-1 mg de dinitrato de isossorbido intracoronário (Isoket®, Schwarz Pharma Ac.). Durante o procedimento manteve-se a monitorização hemodinâmica dos animais, com o registo contínuo da pressão aórtica.

### 1.3 Avaliação electrocardiográfica

Foram realizados eletrocardiogramas de 12-derivações no início do estudo antes da cateterização coronária, após a determinação de IRM e após a injeção das microesferas. A monitorização eletrocardiográfica com registo contínuo foi mantida durante todo o procedimento e as suas alterações foram registadas.



### **1.4 Avaliação do índice da resistência da microcirculação e da reserva de fluxo coronário**

A determinação da pressão intracoronária e da velocidade de fluxo foram efetuadas com um fio guia 0,014 PressureWire™ Certus (St. Jude Medical). Após a equalização das pressões com o sensor na coronária imediatamente a seguir à extremidade do cateter, o fio foi avançado e posicionado com o sensor na união do terço médio com o distal da descendente anterior. Sempre que a navegação deste guia na descendente anterior se revelou difícil, por ser menos maleável, esta foi feita com um guia BMW (Abbott Vascular) e os guias trocados com o auxílio de um microcateter FineCross™ (Terumo Interventional Systems). Desta forma evitou-se prolongar a manipulação intracoronária, diminuindo o risco de vasoespasma e de dissecação, e impedindo-se a danificação do guia de pressões.

Foi utilizada uma consola RadiAnalyzer™ Xpress (St. Jude Medical) e o respetivo software para a determinação da  $P_d$  e do  $T_{mn}$  na descendente anterior. Através do cateter guia foram feitas séries de injeções intracoronárias de 3 ml de soro fisiológico à temperatura ambiente. A média dos 3 valores mais próximos e com curvas temperatura-tempo semelhantes forneceu o  $T_{mn}$  (Figura 9).



**Figura 9 – Imagem da interface da consola RadiAnalyzer™ Xpress (St. Jude Medical) durante a determinação do IRM num dos animais estudados.** Na metade superior da figura observam-se as curvas de pressão, a vermelho a distal e a verde a proximal. Na metade inferior da figura observam-se três curvas de termodiluição resultantes das injeções de soro salino à temperatura ambiente.

Embora o valor de IRM seja o quociente da divisão da  $Pd$  coronária pelo inverso do  $Tmn$  em condições de hiperémia máxima, para efeito dos resultados apresentados neste estudo, e tendo em conta o objetivo de avaliar a sua evolução temporal, consideraram-se todas as determinações como IRM e o avaliado em hiperemia máxima como o verdadeiro IRM. A RFC foi definida como o quociente entre o  $Tmn$  em repouso e o  $Tmn$  em hiperémia máxima.

Após a avaliação da  $Pd$  e do  $Tmn$  em condições basais, mantendo sempre o fio guia na mesma posição, foi determinado o IRM com hiperemia máxima induzida pela injeção intracoronária de 5 mg de papaverina (Labesfal ®),

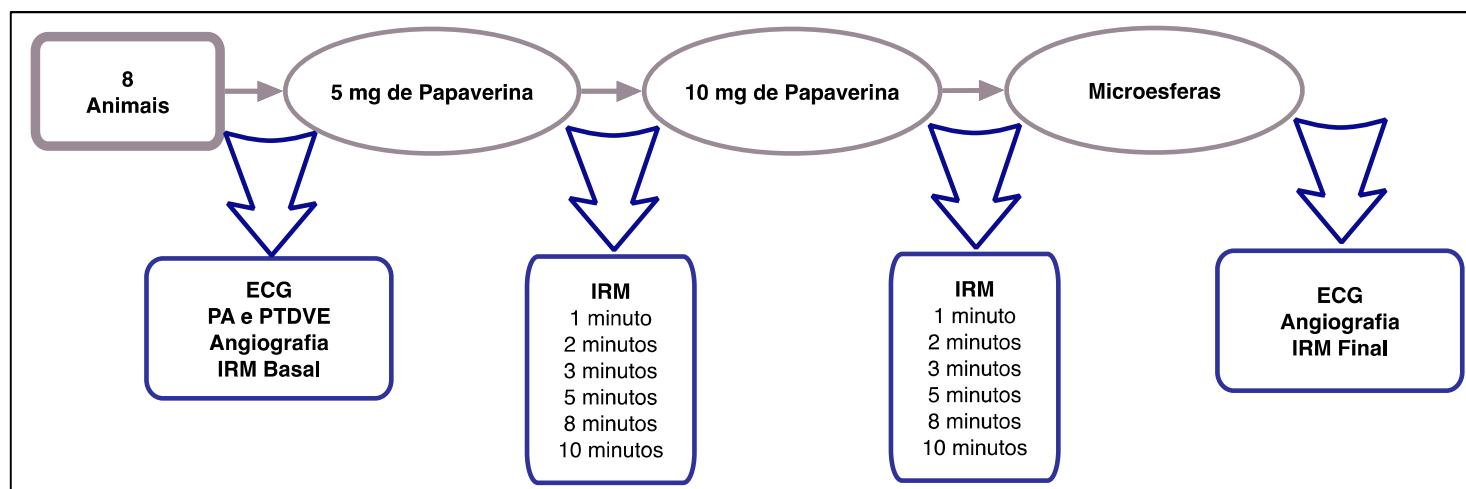
depois da confirmação da descida da pressão distal durante o primeiro minuto e sucessivamente aos 2, 5, 8 e 10 minutos. A seguir a um intervalo de 10 minutos (que permitiu a metabolização da papaverina anteriormente administrada), foi feita a injeção intracoronária de 10 mg papaverina e a mesma sequência de avaliações foi realizada.

### **1.5 Disfunção da microcirculação coronária**

Para comprometer a microcirculação coronária foram injetados 0,25 ml de solução de microesferas de 40  $\mu\text{m}$  de diâmetro (aproximadamente  $30 \times 10^6$  microesferas, Embozene® Microspheres, CeloNova BioSciences), diluídas em contraste e através de um microcateter com a ponta colocada na descendente anterior, distal à primeira diagonal e proximal ao microsensor do fio de pressões, o qual foi mantido na mesma posição. A injeção foi realizada manualmente durante 2 minutos. O número de microesferas foi definido por ser igual ao número planejado de CEM a utilizar na segunda fase e após verificação de que com esta quantidade o fluxo epicárdico não era comprometido (estudo preliminar em dois animais).

Cinco minutos após a injeção das microesferas, avaliou-se o IRM com hiperemia máxima induzida pela injeção intracoronária de 10 mg de papaverina, durante o primeiro minuto e depois de confirmada a descida da pressão distal.

## 1.6 Diagrama



### Principais etapas da experiência da Primeira Fase.

ECG- eletrocardiograma; PA- pressão aórtica; PTDVE- pressão telediastólica do ventrículo esquerdo; IRM- índice da resistência da microcirculação.

## 1.7 Análise estatística

O pressuposto da normalidade foi validado com o teste Kolmogorov-Smirnov com correção de Lillefors, usando o teste de Shapiro-Wilk apropriado para amostras reduzidas. As variáveis categóricas são apresentadas como contagem e percentagem do total. As variáveis contínuas são expressas como média e desvio-padrão. Para avaliar as diferenças entre as condições basais e após os 5 e os 10 mg de papaverina, assim como após a injeção de microesferas, recorreu-se ao teste t de Student para amostras emparelhadas.

O dimensionamento do número de elementos da amostra pode ser escolhido com base nos seguintes fatores: análise da variância (esperada) da amostra em estudo e a análise da potência do teste.

Para avaliação da dimensão da amostra na Segunda Fase foram calculadas as estatísticas descritivas (média e desvio padrão) dos IRM nos vários instantes após a injeção de papaverina, nomeadamente nos instantes: inicial (após a injeção) e após 1, 2, 5, 8 e 10 minutos. Usando esta informação realizou-se um teste *one-way* Anova que analisa a independência estatística entre os vários momentos em análise.

A análise estatística foi realizada com o programa SPSS 20 e teve o apoio da empresa de análise estatística Minalytics.

## 2. Segunda Fase

### 2.1 Manipulação animal

Dezoito suínos cruzados (machos Duroc X fêmeas F1 Large White X Landrace), com um peso de 25 a 40 Kg ( $31 \pm 5$  Kg), foram randomizados para receber por via intracoronária a concentração específica de  $30 \times 10^6$  CEM ou o mesmo volume da solução sem células. Todos os procedimentos efetuados foram iguais entre os grupos e mais uma vez foram aprovados pela Comissão de Ética e Bem-estar Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, autorizados pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária e realizados de acordo com as normas europeias de utilização humanitária e bem-estar animal.

A manipulação dos animais foi semelhante à descrita na Primeira Fase. Todos os animais recetores de células foram eutanasiados no final da experiência por sobredosagem de tiopental de sódio intravenoso. Os animais do grupo de controlo não foram sacrificados e mantiveram-se em quarentena durante 48 horas, sob analgesia e profilaxia infecciosa igual à dos animais da Primeira Fase, não tendo igualmente havido qualquer sinal de sofrimento.

### 2.2 Preparação das células estaminais mesenquimais

Foram utilizados múltiplos frascos de CEM de um dador único, sem relação direta com o estudo e obtidas após consentimento informado por aspirado de medula óssea. As células foram criopreservadas num tanque de azoto líquido.

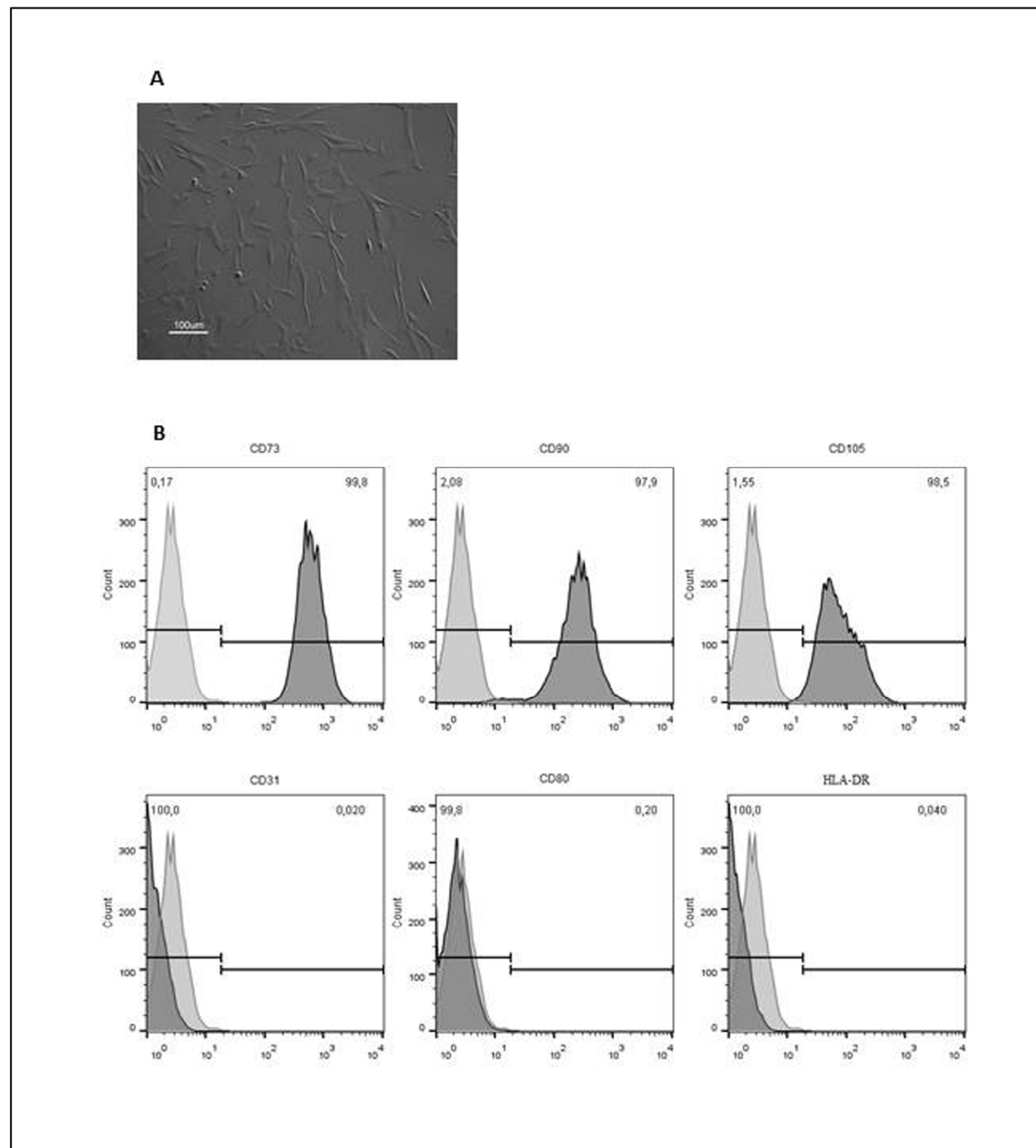
As CEM foram isoladas da fração mononuclear de acordo com o protocolo previamente estabelecido pelo Laboratório de Bioengenharia de Células Estaminais e Medicina Regenerativa, do Instituto Superior Técnico, baseado na capacidade de adesão das células ao plástico (poliestireno) do meio de cultura<sup>359</sup>.

Para o estudo foram descongeladas e colocadas 3000-6000 células / cm<sup>2</sup> em frascos T-175 BD *Falcon*), utilizando *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) + 10% soro fetal bovino e expandidas após consecutivas passagens, para alcançar a dose planeada para administração. As CEM foram expandidas em condições estáticas, com a utilização de dois meios de cultura diferentes: DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e StemPro MSC SFM Xeno-Free (Invitrogen). Nas condições em *xeno-free* os frascos de cultura foram previamente revestidos com CellStart (Invitrogen). Após a cultura alcançar 70 a 80% de confluência, as células foram libertadas com a solução Accutase (Sigma) para o caso de expansão in DMEM e TrypLE (Gibco) no caso de expansão em *xeno-free*. A avaliação do número de células e da sua viabilidade foi realizada com o método de exclusão com azul de triptano, com contagem num hemocitómetro sob microscopia óptica. Foram utilizadas células das passagens P4-P6.

A suspensão celular para administração foi preparada com uma solução de 1% de albumina de forma a prevenir a agregação das células. Amostras das suspensões celulares foram observadas com microscópio óptico, em

diferentes intervalos de tempo para verificação da formação de agregados durante o tempo útil do estudo.

As CEM foram caracterizadas por citometria de fluxo utilizando anticorpos monoclonais específicos: mais de 95% da população tinha de expressar CD73, CD90 e CD105 e não fazê-lo com CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD80 e HLA-DR (Figura 10). O potencial de diferenciação das CEM foi testado com métodos bioquímicos depois da indução *in vitro* da osteogénese, adipogénese e condrogénese, em meios específicos de cultura. Só foram utilizadas células que cumpriram estes critérios, as quais foram transportadas até ao laboratório de hemodinâmica e administradas num intervalo de cerca de 2 horas.



**Figura 10 - Caracterização das células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea, expandidas em frascos de cultura utilizando meios de cultura *Dulbecco's modified eagle medium*, suplementado com 10% de soro fetal bovino. (A) Morfologia das células cultivadas avaliada por microscopia, (B) Imunofenotipagem das CEM avaliada por citometria de fluxo. A percentagem (%) apresentada no canto superior direito de cada histograma indica a expressão de cada antígeno.**



### 2.3 Cateterização cardíaca, avaliação hemodinâmica e angiográfica

A via de acesso utilizada foi novamente a artéria femoral, cateterizada com a técnica de Seldinger e utilizaram-se introdutores e cateteres guia 6 *French*. Por nesta fase a intervenção ter maior duração optou-se por intensificar a anticoagulação com a administração de 300 U kg<sup>-1</sup> de heparina (Heparin Braun®).

A avaliação da pressão arterial na aorta e a pressão telediastólica do ventrículo esquerdo foram determinadas de forma semelhante à da Primeira Fase. Estas foram efetuadas no início do procedimento, antes da cateterização coronária e 30 minutos após a infusão intracoronária da solução experimental.

A cateterização seletiva da coronária esquerda foi realizada com um cateter guia Amplatz esquerdo 0,75, 6 *French* (Cordis), seguindo-se a injeção de 0,5 mg de dinitrato de isossorbido intracoronário (Isoket®, Schwarz Pharma Ac.). As angiografias da coronária esquerda foram realizadas com injeção manual de 10 cc de contraste de base iodada, antes da infusão intracoronária da solução experimental, imediatamente depois e após os 30 minutos. O fluxo coronário epicárdico foi classificado com o sistema de TIMI.

Durante o procedimento manteve-se a monitorização hemodinâmica dos animais com o registo contínuo da pressão aórtica.

### 2.4 Entrega intracoronária das células estaminais mesenquimais

A entrega das células ou da solução acelular foi efetuada cerca de 90 minutos após a sua preparação. Depois da cateterização seletiva da coronária esquerda, um microcateter FineCross<sup>TM</sup> (Terumo Interventional

Systems) foi colocado na artéria descendente anterior, logo após a bifurcação com a primeira diagonal e com a ajuda de um fio guia intracoronário 0,014 BMW® (Abbott Vascular). Através do lúmen central do microcateter foram infundidos 20 cc da solução experimental (com  $30 \times 10^6$  células ou sem células no grupo controlo) a uma velocidade constante de  $4 \text{ cc min}^{-1}$ , utilizando uma seringa infusora. No final o microcateter foi retirado e foi realizada uma angiografia para excluir dissecação e avaliar o fluxo epicárdico.

### **2.5 Avaliação electrocardiográfica**

Eletrocardiogramas de 12-derivações foram realizados no início do estudo, antes da cateterização coronária e 30 minutos após a infusão intracoronária da solução experimental. A monitorização eletrocardiográfica com registo contínuo foi mantida durante todo o procedimento. A frequência cardíaca, alterações da repolarização ventricular e a ocorrência de disritmias foram avaliadas e registadas.

### **2.6 Avaliação da pressão fluxo intracoronário**

A avaliação da pressão intracoronária e do fluxo coronário para determinação do IRM e da RFC foram realizados da mesma forma da descrita na primeira fase. Os resultados foram validados por dois investigadores em simultâneo, que estavam cegos para o grupo a que os animais pertenciam.

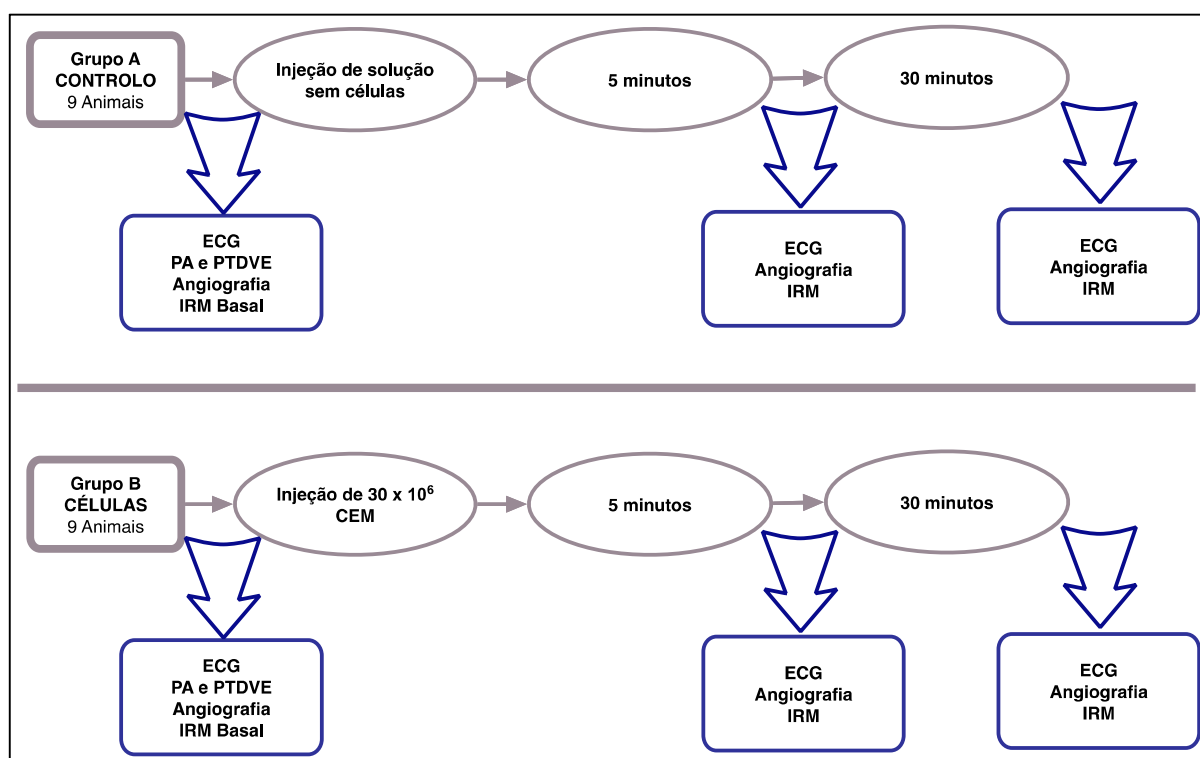
As determinações da pressão intracoronária e do fluxo coronário foram efetuadas em três tempos:

- a) previamente à infusão da solução experimental;
- b) aos 5 minutos após a infusão;
- c) e aos 30 minutos após infusão.

Foi utilizado novamente um guia de pressões PressureWire™ Certus (St. Jude Medical), que após calibração foi posicionado na artéria descendente

anterior e com o sensor no seu terço médio. A posição do fio foi cuidadosamente mantida durante a experiência. A *Pd* e o *Tmn* foram registados com a consola (Radi Medical Systems, St. Jude Medical). O *Tmn* foi avaliado após a injeção rápida de 3 cc de soro à temperatura ambiente através do cateter guia, utilizando-se a média de 3 medições. Para determinação da RFC as medições foram realizadas em condições basais e após hiperémia máxima, provocada pela injeção intracoronária de 10 mg de papaverina (Labesfal - Laboratórios Almiro).

### 2.7 Diagrama



#### Principais etapas da experiência da Segunda Fase.

ECG- eletrocardiograma; PA- pressão aórtica; PTDVE- pressão telediastólica do ventrículo esquerdo; IRM- índice da resistência da microcirculação; CEM- células estaminais mesenquimais.

### 2.8 Análise estatística

O pressuposto da normalidade foi validado com o teste Kolmogorov-Smirnov com correção de Lillefors, usando o teste de Shapiro-Wilk apropriado para amostras reduzidas. As variáveis categóricas são apresentadas como contagem e percentagem do total. As variáveis contínuas são expressas como média e desvio-padrão. A comparação entre o grupo dos animais recetores de CEM e o grupo controlo utilizou o teste t de Student para variáveis independentes. A avaliação intragrupo da média do IRM foi feita com o teste de ANOVA para medidas repetidas e os valores de P ajustados para comparações múltiplas com a correção de Bonferroni. A análise estatística foi realizada com o programa SPSS 20 e teve apoio da empresa de análise estatística Minalytics.

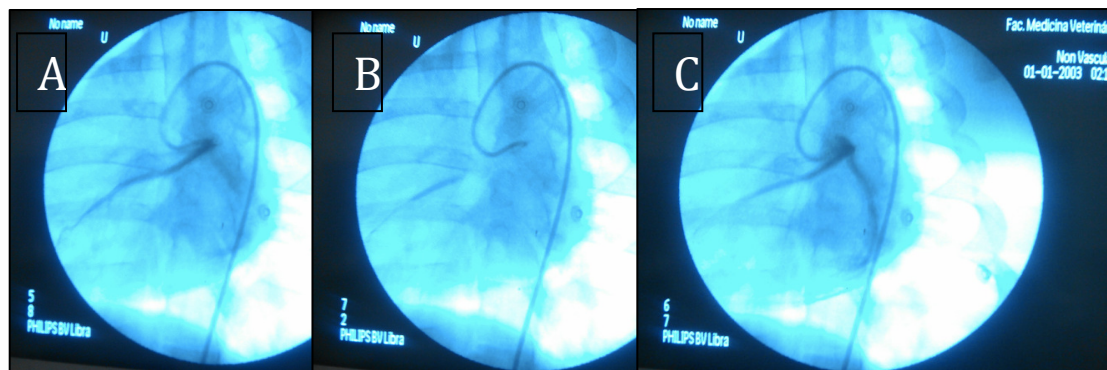
## 3. Terceira Fase

### 3.1 Manipulação animal

Dezoito suínos cruzados (machos Duroc X fêmeas F1 Large White X Landrace), com um peso de 30 a 35 Kg ( $32 \pm 1$  Kg), foram randomizados em três grupos iguais, para receber por via intracoronária consecutivamente 20 cc de uma solução com  $10 \times 10^6$ ,  $15 \times 10^6$  e  $20 \times 10^6$  CEM convencionais (grupo Convencionais),  $10 \times 10^6$ ,  $15 \times 10^6$  e  $20 \times 10^6$  CEM inovadoras (grupo Inovadoras) ou o mesmo volume sem células (grupo Controlo).

Em todos os animais foi provocado um EAM anterior antes da randomização. A indução do enfarte foi realizada sob anestesia geral, com um cateter de balão (3 x 20 mm), colocado após a primeira diagonal e insuflado a 4-8

atmosferas, ocluindo desta forma a artéria descendente anterior durante 90 minutos, a que se seguiu a sua reperfusão (Figura 11).



**Figura 11 – Angiografia da coronária esquerda de um dos animais do estudo. (A)** Observa-se a descendente anterior sem compromisso do fluxo, **(B)** Balão insuflado posicionado no segmento médio da descendente anterior, **(C)** Confirmação da interrupção do fluxo na descendente anterior distal ao balão.

Previamente à oclusão os animais receberam 300 mg p.v. de cloridrato de amiodarona (Cordarone®, Sanofi-Synthelabo) e a ocorrência de disritmias ventriculares foi tratada com desfibrilhação elétrica externa imediata, massagem cardíaca e adrenalina p.v. (Labesfal - Laboratórios Almiro) de acordo com necessidade de ressuscitação. Durante o procedimento os animais foram monitorizados e no recobro foi realizada analgesia e antibioticoterapia de forma igual à descrita na Primeira Fase. Os animais foram mantidos com antiagregação plaquetária dupla com ácido acetilsalicílico 100 mg dia *per os* (Aspirina GR®, Bayer) + clopidogrel 75 mg dia *per os* (Generis Farmacêutica, S.A), e com imunossupressão com ciclosporina A 100 mg dia *per os* (Generis Farmacêutica, S.A), iniciados no dia anterior.

Todos os procedimentos efetuados foram iguais entre os grupos e mais uma vez foram aprovados pela Comissão de Ética e Bem-estar Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, autorizados pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária e realizados de acordo com as normas europeias de utilização humanitária e bem-estar animal.

A restante manipulação dos animais foi semelhante à descrita na Primeira Fase. Todos os animais foram eutanasiados no final da experiência por sobredosagem de tiopental de sódio intravenoso, e exsanguinação por via femoral.

### **3.2 Preparação das células mesenquimais**

Foram utilizados dois protocolos de expansão celular:

- a) um protocolo “convencional” igual ao descrito na Segunda Fase, baseado na cultura celular em condições estáticas;
- b) um protocolo “inovador”, baseado numa estratégia desenvolvida pelo Laboratório de Bioengenharia de Células Estaminais e Medicina Regenerativa, do Instituto Superior Técnico, que envolve a cultura das CEM aderentes a microcarregadores de plástico, em ambiente agitado e sem a utilização de meios de cultura com componentes animais <sup>360</sup>.

Mais uma vez as CEM foram obtidas de aspirados de medula óssea de dadores humanos, sem relação direta com o estudo e após consentimento informado. Considerando a potencial variabilidade entre dadores, foram utilizadas CEM de 2 indivíduos e para cada um foram originadas células com ambos protocolos. O isolamento da CEM foi efetuado de acordo com o descrito na Segunda Fase.

Na expansão inovadora as células foram expandidas em ambiente agitado e com microcarregadores, utilizando o meio StemPro® MSC SFM XenoFree. Os microcarregadores de poliestireno foram revestidos com CELLstart™ (Invitrogen). Foram inoculadas 100000 células / ml, em frascos giratórios (Spinner Flasks – Bellco) com velocidade de 40 rpm.

O número de passagens foi limitado a P4-P6, evitando a utilização de células sujeitas a um número de duplicações superior a 20 por questões de segurança<sup>361</sup>.

As CEM foram caracterizadas por citometria de fluxo e o seu potencial de diferenciação foi avaliado de igual forma à descrita na Segunda Fase. As dimensões das células foram determinadas por microscopia óptica e usando o *software* ImageJ.

### **3.3 Cateterização cardíaca, avaliação hemodinâmica e angiográfica**

Os procedimentos relacionados com a cateterização cardíaca foram semelhantes aos descritos na Primeira e na Segunda Fase. A avaliação hemodinâmica e angiográfica foi efetuada no início de cada cateterismo, após a indução do EAM, após cada infusão intracoronária e no final de cada determinação do IRM, também como já descrito previamente.

### **3.4 Entrega intracoronária das células estaminais mesenquimais**

A entrega das células ou da solução acelular foi efetuada cerca de 90 minutos após a finalização da preparação das CEM. A técnica de injeção intracoronária das células foi sobreponível à descrita na Segunda Fase.

Seis a sete dias depois do EAM os animais foram randomizados em três grupos. Um grupo (Controlo) recebeu a solução sem células, o grupo Convencionais recebeu as CEM convencionais e o grupo Inovadoras as CEM inovadoras. Foi realizado um estudo de dose resposta com o escalonamento da dose de células administrada. Em cada grupo foram realizadas 3 injeções intracoronárias de 20 cc de solução a um ritmo de 4 cc / min, a primeira contendo  $10 \times 10^6$  de células, a segunda com  $15 \times 10^6$  e a terceira contendo  $20 \times 10^6$ , perfazendo um total de  $45 \times 10^6$  de CEM. O grupo controlo recebeu

o mesmo volume de solução sem células. As injeções foram separadas por intervalos de pelo menos 15 minutos.

### **3.5 Avaliação eletrocardiográfica**

Eletrocardiogramas de 12-derivações foram realizados no início do estudo, antes do EAM e no final da sua indução no primeiro cateterismo, antes da administração de células e após esta no segundo cateterismo, e no final da experiência às 5 semanas no terceiro cateterismo. A monitorização eletrocardiográfica com registo contínuo foi mantida durante os procedimentos. A frequência cardíaca, as alterações da repolarização ventricular e a ocorrência de disritmias foram avaliadas e registadas.

### **3.6 Avaliação da pressão e fluxo intracoronário**

A avaliação da pressão intracoronária e do fluxo coronário para determinação do IRM e da RFC foi realizada da mesma forma à descrita na Primeira Fase. Os resultados foram avaliados por dois investigadores em simultâneo.

As determinações da pressão intracoronária e do fluxo coronário foram efetuadas nos seguintes tempos:

- a) no dia 1, previamente à provocação do EAM;
- b) no dia 6-7, antes e 10 minutos após cada uma das três infusões celulares e 30 minutos após a última;
- c) às 5 semanas (4 após a entrega das células), antes dos animais serem eutanasiados.

### **3.7 Avaliação anatomopatológica**

No dia do transplante as células foram marcadas com o corante fluorescente PKH26 (Sigma Aldrich) para avaliar a sua distribuição no coração.



Às 5 semanas (4 após a entrega das células) os animais foram sacrificados e o seu coração removido. Mediram-se a espessura da parede ventricular no ponto em que a atrofia é mais relevante (geralmente no 2º ou 3º corte) e o comprimento do coração no sentido transversal, ou seja no eixo perpendicular ao septo interventricular. A razão entre estas duas medidas foi utilizada para aferir as dimensões do enfarte provocado.

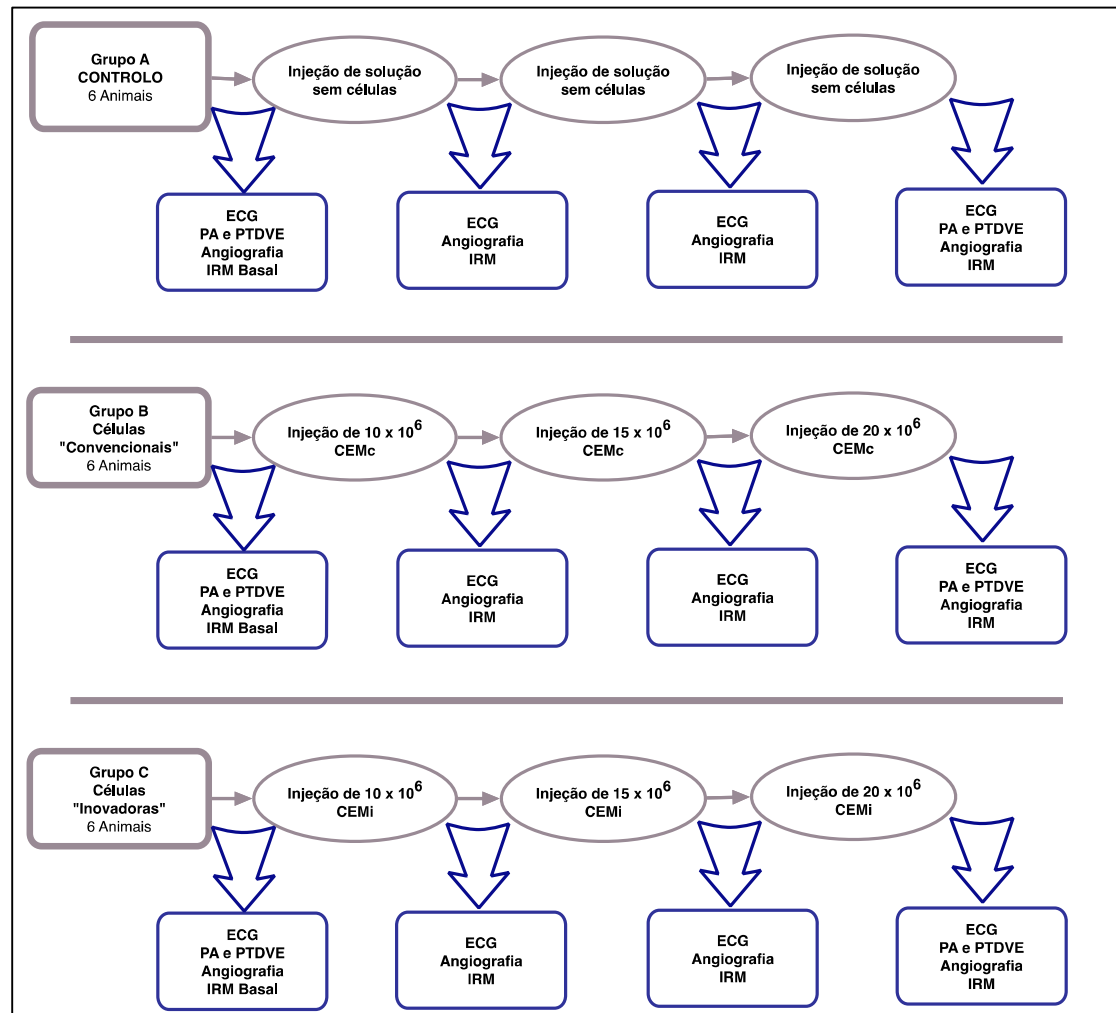
Foram obtidos cortes transversais do coração, com cerca de 5 mm de espessura, fixados com formol tamponado a 10% e embebidos em parafina para coloração com Hematoxilina-Eosina (H&E). A evolução das alterações histológicas em relação com o enfarte foi classificada em estádios de acordo com a Tabela 6. A contagem dos capilares foi realizada em microfotografias tiradas em 5 campos diferentes.

Para avaliar o potencial de enxerto das CEM transplantadas e em particular na região de enfarte, a presença de células (marcadas com corante fluorescente PKH26, Sigma Aldrich) foi pesquisada por microscopia de fluorescência.

**Tabela 6 - Estádios evolutivos de enfarte do miocárdio classificados pelas alterações na avaliação histológica.**

<b>Estádio</b>	<b>Alterações observadas</b>
<b>1</b>	Sem lesões.
<b>2</b>	Edema fibrillar dos cardiomiócitos.
<b>3</b>	Hialinização dos cardiomiócitos com eosinofilia do sarcoplasma e perda da estriação. Eventualmente pode surgir granulação do sarcoplasma e degenerescência gorda dos cardiomiócitos.
<b>4</b>	Necrose completa e início da reação inflamatória com congestão, edema e infiltração leucocitária (células inflamatórias começam a invadir o tecido lesado).
<b>5</b>	Predominam as zonas de necrose com fibras necrosadas não removidas, mas já se identifica pequenos territórios de tecido de granulação rico em células inflamatórias ainda rico em neutrófilos
<b>6</b>	As zonas com fibras necrosadas não removidas são equivalentes em área ao tecido de granulação rico em células inflamatórias sendo ainda frequentes os neutrófilos
<b>7</b>	As zonas de persistência de fibras necrosadas são escassas; o tecido de granulação é rico em células inflamatórias mononucleadas, sendo escassos os neutrófilos.
<b>8</b>	As zonas de persistência de fibras necrosadas são vestigiais, com o tecido de granulação rico em células inflamatórias mononucleadas sendo substituído por tecido conjuntivo fibroso. A formação de neovasos é reduzida.
<b>9</b>	O tecido de granulação suplanta em área o tecido conjuntivo / cicatricial. A formação de neovasos é evidente. Há neutrófilos presentes no território lesado ou nos vasos que o irrigam.
<b>10</b>	Tecido de granulação em pequenas áreas ou inexistente enquanto tecido com continuidade. O tecido conjuntivo predomina com fibras pouco densas ou separadas por edema. Granulomas dispersos ou confluentes. O número de neovasos é significativo.
<b>11</b>	Tecido conjuntivo fibroso predomina e preenche todos os territórios de necrose. Os neovasos ainda são numerosos. Granulomas formados por células mononucleadas com escassos neutrófilos e/ou eosinófilos. Células gigantes multinucleadas ocasionais.
<b>12</b>	Tecido conjuntivo fibroso predomina e preenche todos os territórios de necrose, rico em fibras de colagénio com riqueza variável em células, formando feixes bem direcionados em paralelo com a parede cardíaca. Os neovasos são escassos. Poucos ou nenhuns granulomas formados por células mononucleadas.

### 3.8 Diagrama



#### Principais etapas da experiência da Terceira Fase (segundo cateterismo).

ECG- eletrocardiograma; PA- pressão aórtica; PTDVE- pressão telediastólica do ventrículo esquerdo; IRM- índice da resistência da microcirculação; CEM- células estaminais mesenquimais.

### 3.9 Análise estatística

O pressuposto da normalidade foi avaliado com o teste Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors, usando o teste de Shapiro-Wilk apropriado para amostras reduzidas. Constatando-se a não normalidade, foram utilizados os testes não paramétricos adequados: teste de *Mann-Whitney U* para comparação de dois grupos independentes; a análise de *Kruskal-Wallis* para a comparação de três grupos independentes; o teste de Wilcoxon e a análise de *Friedman's two-way* foram utilizados para a avaliação de variáveis dependentes. As variáveis categóricas são apresentadas como contagem e percentagem do total. As variáveis contínuas são expressas como média e desvio-padrão. A análise estatística foi realizada com o programa SPSS 20 e contou com o apoio da empresa de análise estatística Minalytics.

# Resultados

---



## VI. RESULTADOS

### 1. Primeira Fase

Os parâmetros hemodinâmicos de base foram: frequência cardíaca de  $92 \pm 10$  bpm, pressão arterial média de  $48 \pm 5$  mm Hg e pressão telediastólica do ventrículo esquerdo de  $6 \pm 1,4$  mm Hg. Todos os animais mantiveram estabilidade hemodinâmica e eletrocardiográfica após as injeções de papaverina. Com o compromisso de microcirculação houve elevação do segmento ST em V1-V3 em todos os animais, não havendo disritmias ventriculares ou instabilidade hemodinâmica na população estudada.

Em cada animal foram realizadas 14 determinações de IRM, num total de 112 na amostra avaliada. O coeficiente de variação do  $Tmn$  das três medições consideradas para o cálculo do IRM em hiperemia máxima foi de 10 %. A  $Pd$  média de base foi de  $51 \pm 9$  mmHg. Na Tabela 7 estão apresentados os valores de  $Pd$ , que refletem a hiperemia máxima após a injeção de papaverina, não havendo diferenças entre as duas doses.

**Tabela 7 - Resposta da pressão distal média à injeção intracoronária de papaverina.** Médias e desvio padrão, diferenças avaliadas com o teste  $t$  de Student para variáveis dependentes (n=9).

	Papaverina 5 mg	Papaverina 10 mg	P
$Pd$ (mmHg)	$39 \pm 9$	$40 \pm 7$	0,7
Diferença $Pd$ base (mmHg)	$- 11,4 \pm 5$	$- 10,6 \pm 5$	0,7
Variação $Pd$ base (%)	$22 \pm 10$	$21 \pm 8$	0,5

$Pd$  - pressão distal média.

Os valores de IRM para cada animal estão apresentados na Tabela 8. A média do verdadeiro IRM foi de  $11 \pm 4,5$  U com 5 mg de papaverina e de  $10,6 \pm 3$  U com a dose de 10 mg ( $p=0,612$ ).

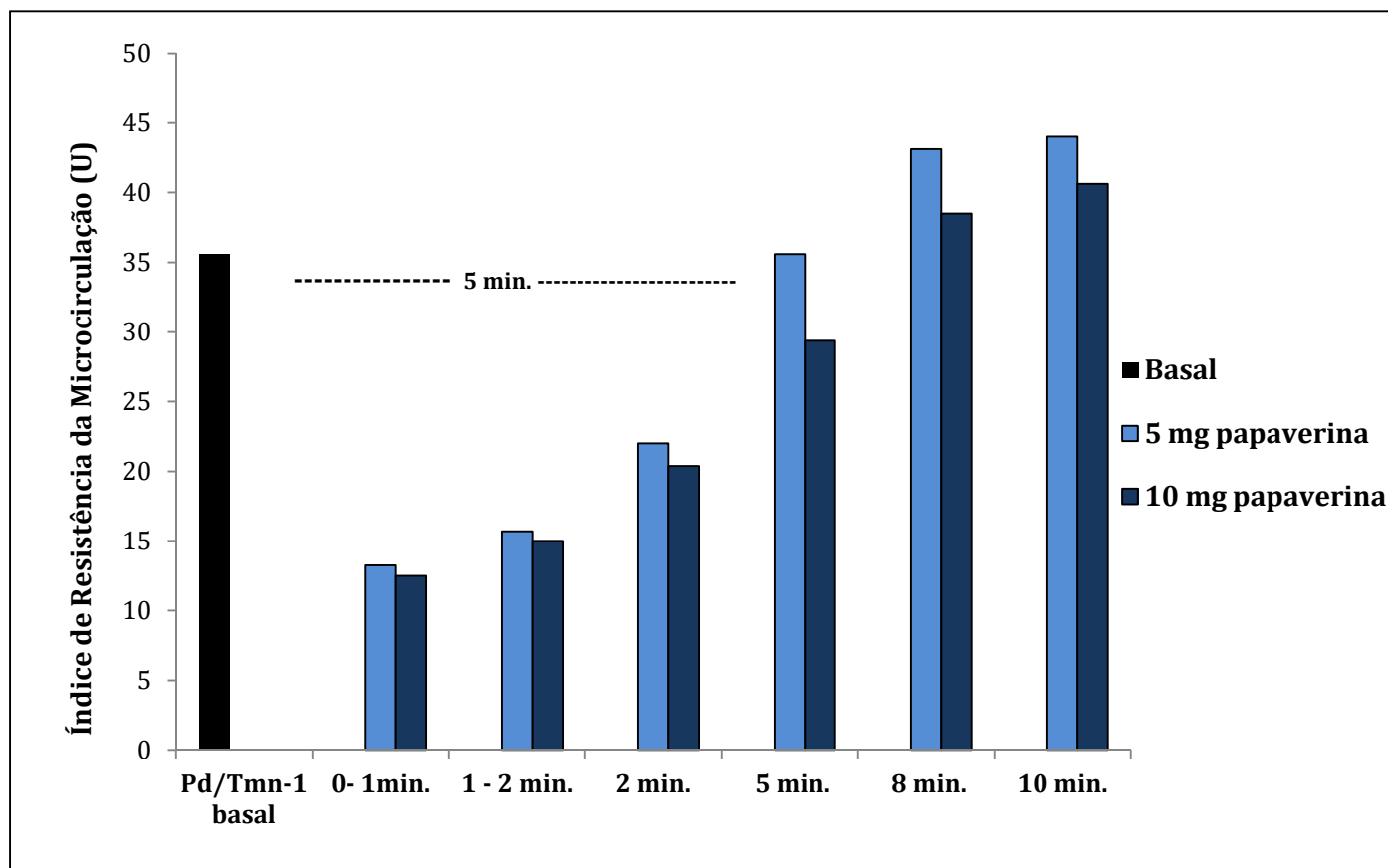
**Tabela 8 - Valores observados por animal do quociente da *Pd* e do inverso da *Tmn* em condições basais, após indução de hiperemia máxima com 5 e 10 mg de papaverina (IMR 5 e 10 mg) e após o compromisso da microcirculação com microesferas.**

Animais	$Pd/Tmn^{-1}$ basal	IRM (U) 5 mg	IRM (U) 10 mg	IRM (U) pós_microesferas
1	23	7	8	35
2	42	7	8	31
3	25	9	9	71
4	28	13	14	52
5	56	11	11	23
6	33	10	9	46
7	30	10	10	46
8	48	21	16	26

*Pd* – pressão distal média. *Tmn* – tempo médio de trânsito. IRM- índice da resistência da microcirculação.

Com ambas as doses de papaverina o IRM verdadeiro foi observado ao primeiro minuto em 5 animais, logo após o primeiro minuto em 2 e logo após os 2 minutos em 1 animal. A evolução temporal dos valores de IRM foi semelhante com as duas doses (Figura 12), tendo o IRM deixado de ter diferenças em relação ao valor de base aos 5 minutos ( $p=1$  para os 5 mg e  $p=0,98$  para os 10 mg).

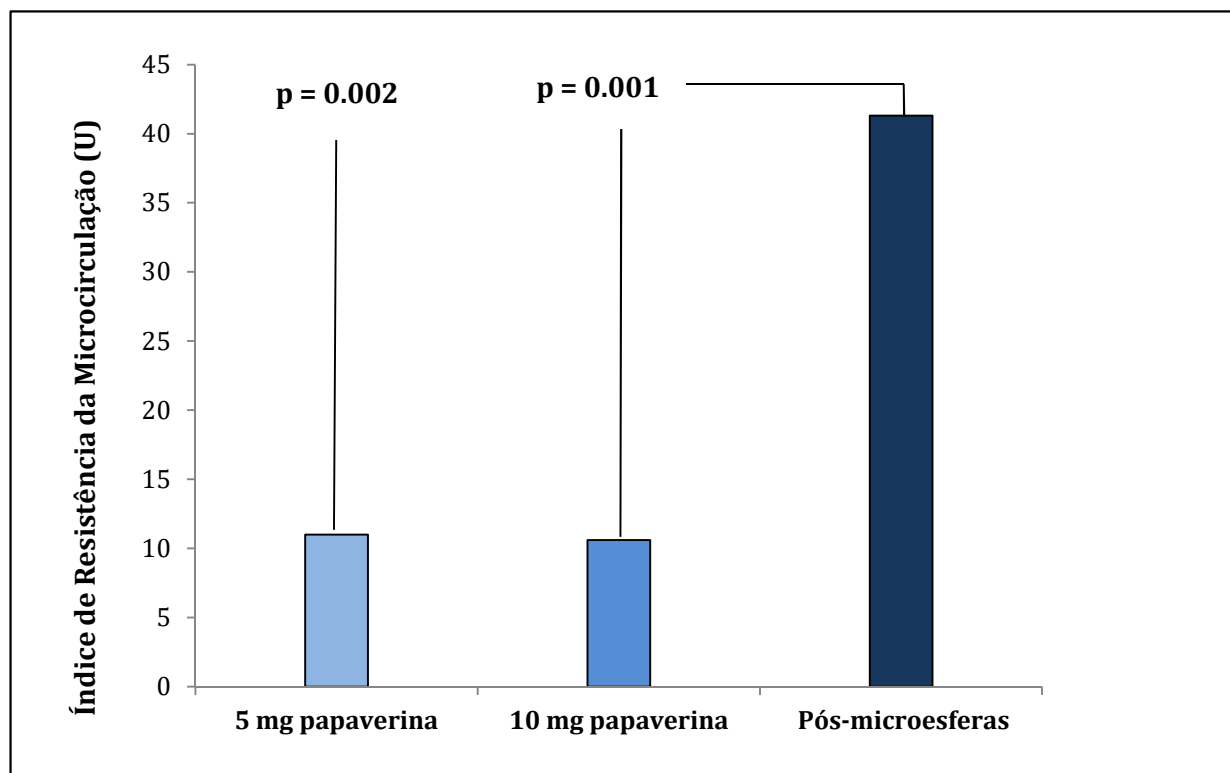




**Figura 12 - Evolução temporal do IRM após injeção intracoronária de papaverina e comparação com  $Pd/Tmn^{-1}$  de base.**

Min- minutos.  $Pd$  – pressão distal média.  $Tmn$  – tempo médio de trânsito.

Com o compromisso da microcirculação após a injeção das microesferas houve uma elevação significativa do verdadeiro IRM em todos animais para um valor médio de  $41,3 \pm 16$  U (Figura 13;  $p=0,002$  com 5mg de papaverina;  $p=0,001$  com 10 mg de papaverina). A elevação média do IMR verdadeiro foi de  $310 \pm 190$  %.



**Figura 13 - IRM após o compromisso de microcirculação coronária com microesferas em comparação com o valor inicial determinado com 5 e 10 mg de papaverina.** Diferenças para o valor de base avaliadas com o teste *t* de Student para amostras emparelhadas (n=9).

O número de elementos da amostra é importante por permitir realizar inferência estatística sobre toda a população. O dimensionamento do número de elementos da amostra foi calculado através da análise das estatísticas descritivas (média e desvio padrão) dos IRM nos vários instantes após a injeção de papaverina, nomeadamente nos instantes: inicial (após a injeção), e pós 1, 2, 5, 8 e 10 minutos. Usando esta informação realizou-se um teste one-way Anova que analisa a independência estatística entre os vários momentos em estudo.

Nos dados da papaverina 5mg obteve-se uma potência de 0,92, e um *f-effect size* de 0,64, que correspondem a uma boa representatividade. Por sua vez, para a papaverina 10mg, obteve-se uma potência de 0,90 e um *f-effect size*

de 0,63, que também indicam uma boa representatividade. Nesta perspectiva o número de 8 elementos da amostra é suficiente, não sendo necessário incluir mais animais no estudo e podendo ser utilizadas ambas as doses de papaverina.

### **2. Segunda Fase**

Os resultados da avaliação hemodinâmica estão apresentados na Tabela 9. Não houve diferenças nos parâmetros de base entre o grupo que recebeu CEM e o grupo controle. Depois da infusão de CEM não houve alterações significativas da frequência cardíaca, da pressão telediastólica do ventrículo esquerdo e da pressão aórtica sistólica. De igual forma não houve diferenças com significado na avaliação angiográfica e todos os animais apresentaram fluxo coronário TIMI 3, imediatamente após a infusão e 30 minutos depois. Durante todos os procedimentos não houve elevação do segmento ST ou disritmias ventriculares na avaliação eletrocardiográfica.

**Tabela 9 - Peso e parâmetros hemodinâmicos de base e pós-infusão nos animais do grupo Controlo e do grupo CEM.** Médias e desvio padrão, diferenças avaliadas com o teste *t* de Student para variáveis independentes (n=9).

	CONTROLO	CEM	P
Peso (kg)	31 ± 2	32 ± 2	0,8
Freq. cardíaca (bpm)	106 ± 5	100 ± 5	0,5
Pressão aórtica sistólica (mmHg)	98 ± 7	93 ± 3	0,4
Pressão telediastólica do VE (mmHg)	7,7 ± 2	7,3 ± 2	0,7
Freq. cardíaca pós-células (bpm)	114 ± 23	111 ± 15	0,7
Pressão aórtica sistólica pós- células (mmHg)	96 ± 18	88 ± 13	0,3
Pressão telediastólica do VE pós- células (mmHg)	8,3 ± 3	8,2 ± 3	0,9

CEM – células estaminais mesenquimais. Freq.- frequência. VE- ventrículo esquerdo.

Foram realizadas 54 medições da RFC e do IRM na população estudada. O coeficiente de variação da medição dos 3 tempos de trânsito de cada avaliação foi de 6% em repouso e de 11% durante a hiperemia máxima. A redução média da pressão coronária distal após a injeção de papaverina foi de 18 ± 7 mmHg no grupo Controlo e de 14 ± 5 mmHg no grupo CEM (p=0,2), o que representa uma redução relativa de 27% e 22% respetivamente.

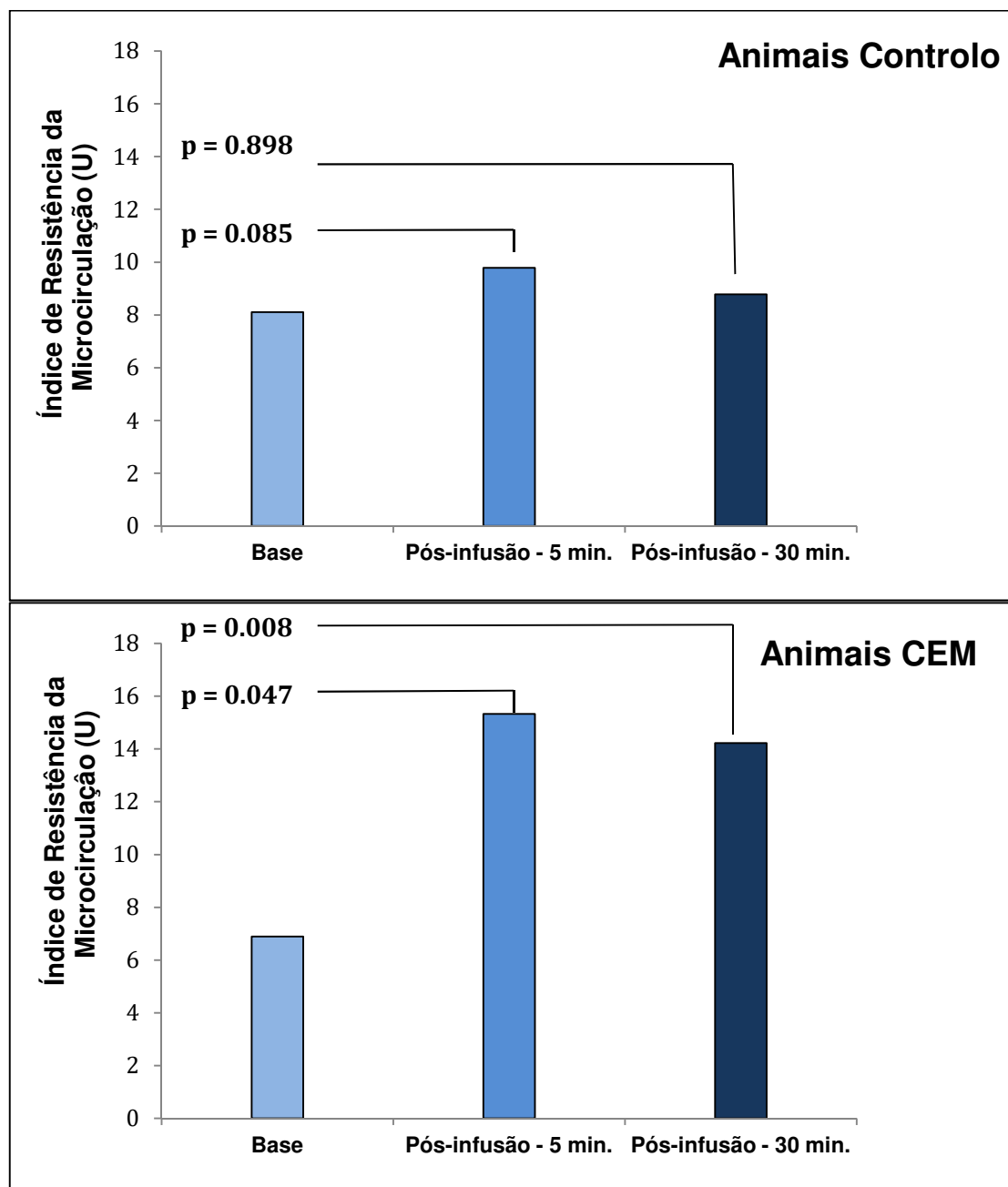
Os valores médios da RFC e do IRM estão apresentados na Tabela 10. A RFC e o IRM de base foram semelhantes entre dos dois grupos. Após a infusão intracoronária não se observaram diferenças significativas da RFC, embora tenha havido uma ligeira redução no grupo CEM. Quanto ao IRM, observou-se uma elevação expressiva nos animais que receberam células, tendo a diferença alcançado significado estatístico na avaliação aos 30 minutos.

**Tabela 10 - Valores da reserva de fluxo coronário e do índice de resistência da microcirculação nos animais do grupo Controlo e do grupo CEM.** Médias e desvio padrão, diferenças avaliadas com o teste *t* de Student para variáveis independentes (n=9).

	CONTROLO	CEM	P
RFC de base	3,8 ± 1	4 ± 2	0,7
IRM de base (U)	8,1 ± 1	6,7 ± 0,6	0,3
RFC pós-infusão – 5 min.	3,6 ± 1	3 ± 2	0,5
RFC pós-infusão – 30 min.	3,8 ± 2	2,3 ± 1,5	0,064
IRM pós-infusão – 5 min. (U)	<b>9,8 ± 1</b>	<b>15,3 ± 2,8</b>	<b>0,08</b>
IRM pós-infusão – 30 min. (U)	<b>8,8 ± 1</b>	<b>14,2 ± 1,8</b>	<b>0,02</b>

CEM – células estaminais mesenquimais. IRM- índice de resistência da microcirculação.  
RFC - reserva de fluxo coronário.

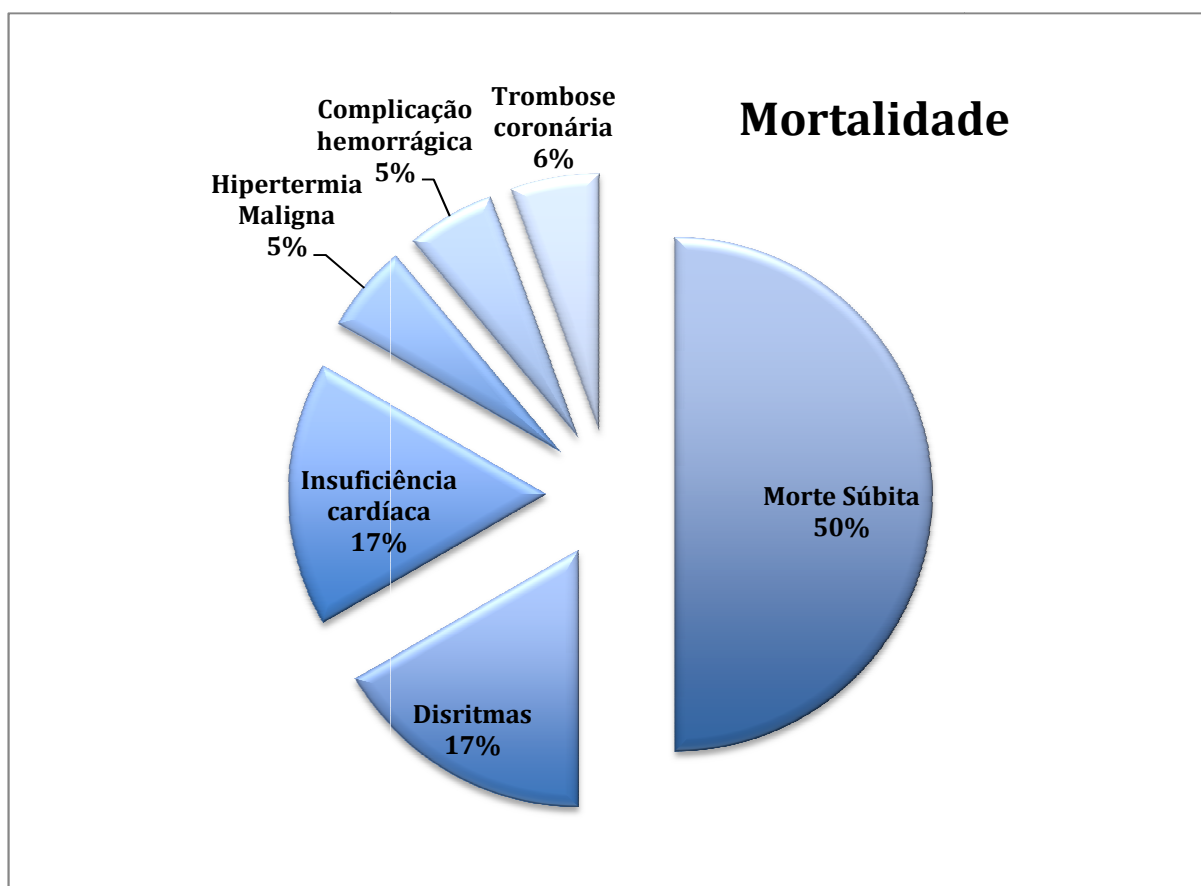
A Figura 14 mostra os resultados da comparação intragrupo da média do IRM nos três momentos. Com a análise de variância para medidas repetidas a média do IRM foi significativamente diferente entre os tempos de avaliação nos animais que receberam células ( $F(2-16)=8,925$ ,  $p=0,002$ ). Nestes animais o valor de base do IRM foi  $6,7 \pm 0,6$  U, e depois da infusão intracoronária das CEM subiu para  $15,3 \pm 2,8$  U aos 5 minutos (correspondendo a um aumento de 128%,  $p=0,047$ ) e para  $14,2 \pm 1,8$  U aos 30 minutos (aumento de 112%,  $p=0,008$ ). No grupo controlo também houve uma diferença, embora muito próxima do nível de significância, entre os três momentos de aferição do IRM ( $F(2-16)=3,897$ ,  $p=0,042$ ), embora os testes *post hoc* com a correção de Bonferroni não permitam revelar entre que momentos residia esta diferença. O valor de base do IRM nos animais controlo foi  $8,1 \pm 1,0$  U, e após a infusão intracoronária da solução acelular elevou-se para  $9,8 \pm 1,0$  U aos 5 minutos (aumento de 21%,  $p=0,085$ ) e para  $8,8 \pm 1$  U aos 30 minutos (aumento de 9%,  $p=0,898$ ).



**Figura 14 - O Índice de Resistência da Microcirculação – resultados de base, aos 5 e aos 30 minutos após a infusão intracoronária no grupo Controlo e no grupo CEM.** Diferenças para o valor de base avaliadas com ANOVA para medidas repetidas e valores de P ajustados para comparações múltiplas (Bonferroni) (n=9).

### 3. Terceira Fase

Foram cateterizados 36 animais para concluir o estudo. A mortalidade total foi de 50%. As principais causas de morte estão apresentadas na Figura 16. Quatro animais morreram durante a indução do enfarte (3 por fibrilhação ventricular e 1 por hipertermia maligna); 4 animais morreram durante o segundo cateterismo (1 por trombose da descendente anterior não relacionada com a infusão intracoronária, 3 por insuficiência cardíaca com progressão para choque cardiogénico ou edema agudo do pulmão), 1 animal morreu por complicação hemorrágica relacionada com a punção femoral e 9 animais foram vítimas de morte súbita.



**Figura 16 – Causas de morte dos animais excluídos.** Percentagem em relação ao total dos animais que morreram antes de completarem o estudo (n=18).

Foram realizadas 126 medições da RFC e do IRM na população estudada. Em média o coeficiente de variação dos 3 tempos de trânsito de cada avaliação foi de 4,4% de base e de 4% durante a hiperemia máxima.

Os resultados desta fase permitiram vários tipos de avaliação com propósito e relevância diferentes.

### 3.1 Antes e após a indução do EAM

Nos 18 animais que completaram o estudo compararam-se as principais variáveis hemodinâmicas e do estado da circulação coronária, entre a situação de base (D0) e sete dias após a indução do EAM (D7 pós-EAM). Os principais resultados estão representados na Tabela 11.

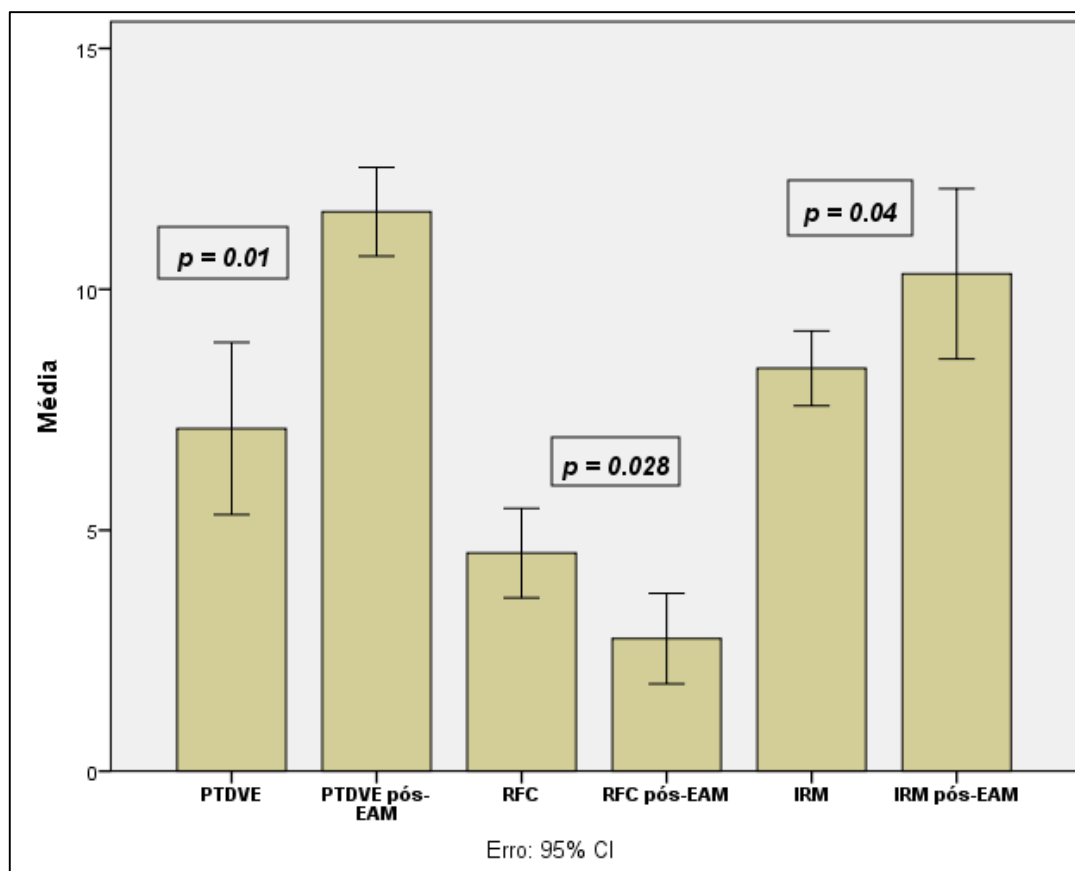
**Tabela 11 - Valores hemodinâmicos, da reserva de fluxo coronário e do índice de resistência da microcirculação nos animais antes (D0) e sete dias após a indução do enfarte agudo do miocárdio (D7 pós-EAM).** Médias e desvio padrão, diferenças avaliadas com o teste de Wilcoxon para amostras emparelhadas (n=18).

	D0	D7 PÓS-EAM	P
Pressão aórtica sistólica (mmHg)	87 ± 9	85 ± 12	0,556
PTDVE (mmHg)	<b>7 ± 3,5</b>	<b>12 ± 1,9</b>	<b>0,01</b>
Freq. cardíaca (bpm)	104 ± 17	112 ± 20	0,17
RFC	<b>4,5 ± 1,9</b>	<b>2,7 ± 1,9</b>	<b>0,028</b>
IRM (U)	<b>8,3 ± 1,7</b>	<b>10,3 ± 3,5</b>	<b>0,04</b>

EAM – enfarte agudo do miocárdio. Freq. – frequência. IRM- índice de resistência da microcirculação. RFC - reserva de fluxo coronário. PTDVE – pressão telediastólica do ventrículo esquerdo.

As diferenças com significado estatístico encontradas foram a elevação da pressão telediastólica do ventrículo esquerdo e do IRM, acompanhados pela diminuição da RFC (Figura 17).





**Figura 17 – Parâmetros com diferenças significativas 1 semana após a indução do enfarte agudo do miocárdio.** Médias e desvio padrão, diferenças avaliadas com o teste de Wilcoxon para amostras emparelhadas (n=18).

EAM – enfarte agudo do miocárdio. IRM- índice de resistência da microcirculação.  
RFC - reserva de fluxo coronário. PTDVE- pressão telediastólica do ventrículo esquerdo.

### 3.2 Caracterização das células estaminais mesenquimais

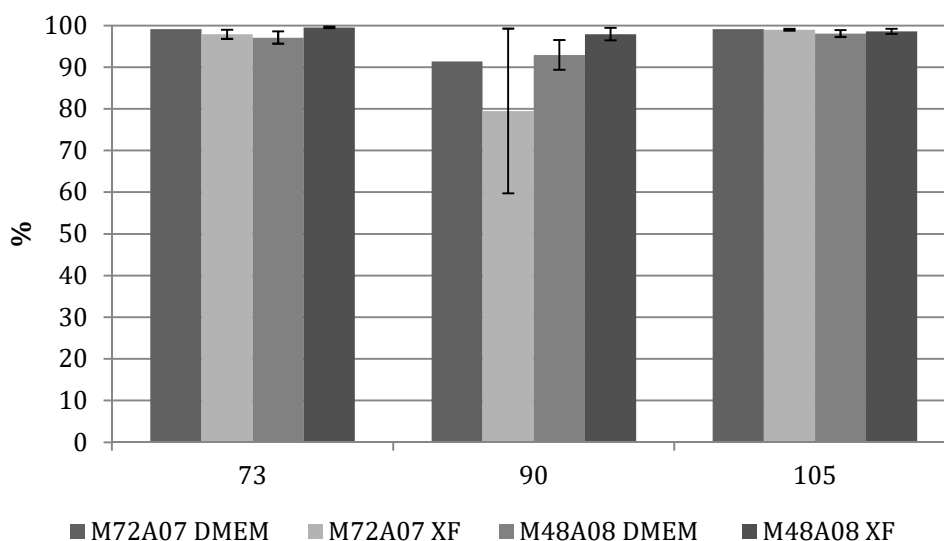
O estudo foi efetuado com a utilização de células estaminais mesenquimais humanas de dois dadores (M72A07 e M48A08) entre as passagens P4-P6. A expansão foi realizada com duas metodologias diferentes: a) convencional, estática com frascos – T e DMEM + 10 % de soro fetal bovino; b) inovadora, com frascos de rotação e *XenoFree StemPro Media*. Na avaliação com microscopia óptica as células dos dois dadores apresentaram dimensões menores quando expandidas com a metodologia inovadora (Tabela 12).

**Tabela 12 – Diâmetro das células estaminais mesenquimais expandidas com metodologia convencional e inovadora.** Avaliação por microscopia óptica e usando o *software* ImageJ. Médias e desvio padrão.

	M72A07	M48A08
Células Convencionais – DMEM (µm)	15,93 ± 0,46	16,2 ± 0,42
Células Inovadoras - XF( µm)	11,50 ± 0,24	11,87 ± 0,26

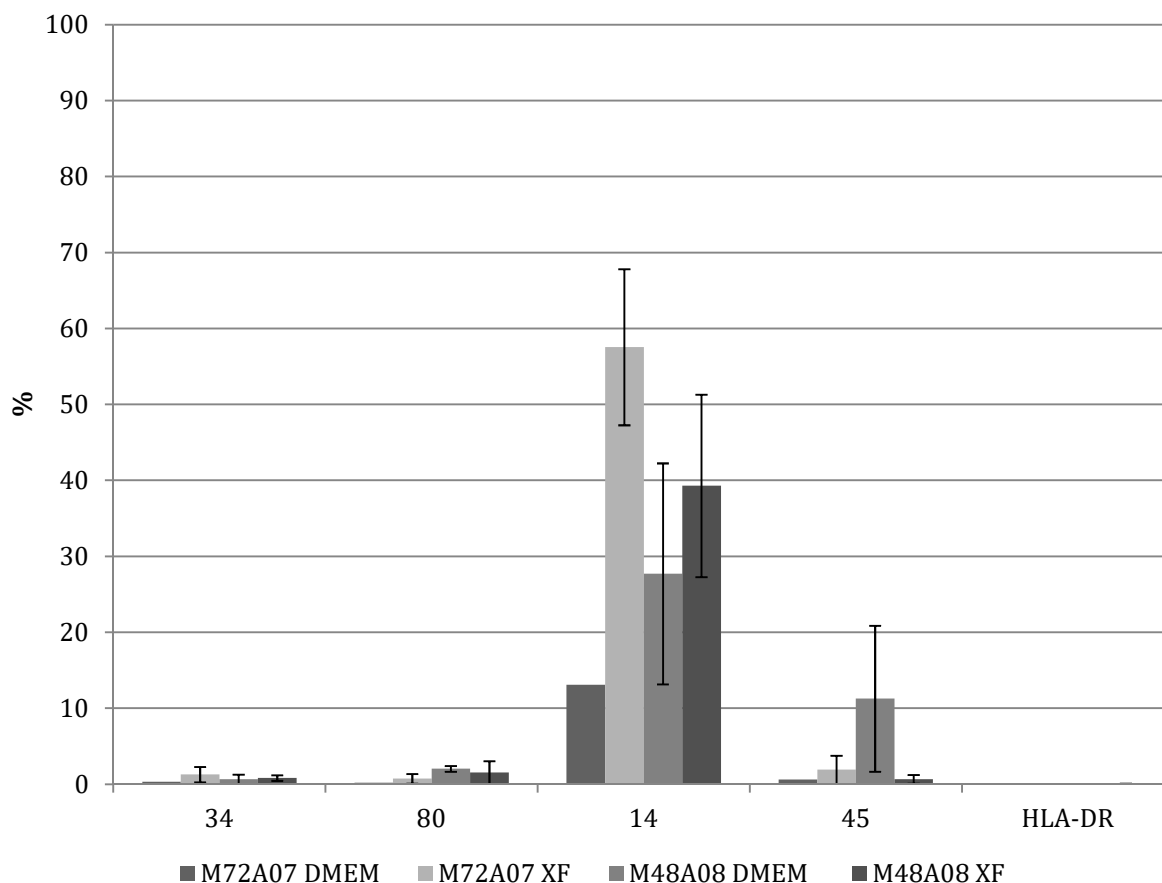
DMEM – *Dulbecco's modified eagle medium*. XF – *XenoFree*.

Na avaliação por citometria de fluxo, realizada após a expansão, mais de 95% da população expressou CD73 e CD105 como esperado, mas a expressão de CD90 ficou um pouco aquém desse valor nas células do dador M72A07 (Figura 18).



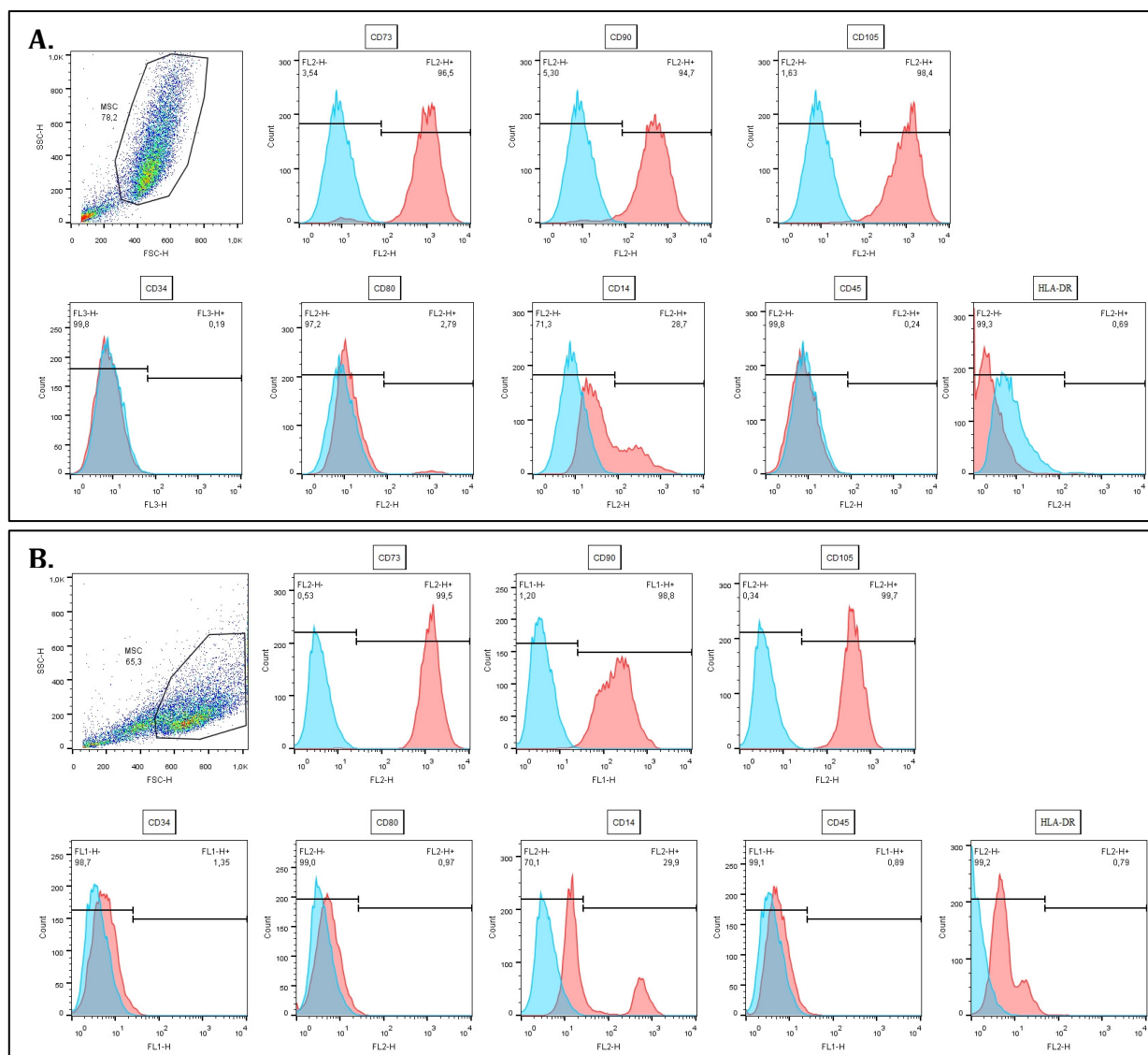
**Figura 18 – Expressão de CD73, CD90 e CD105 avaliadas por citometria de fluxo nas células dos dadores M72A07 e M48A08.** Percentagem em relação ao total das células avaliadas.

Também como esperado, a expressão de CD19, CD31, CD34, CD45, CD80 e HLA-DR foi inferior a 2%. Contudo, a expressão de CD14 foi superior ao que está definido (Figura 19).



**Figura 19 - Expressão de CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD80 e HLA-DR, avaliadas por citometria de fluxo nas células dos doadores M72A07 e M48A08. Percentagem em relação ao total das células avaliadas.**

Na figura seguinte estão apresentados em histograma os resultados da imunofenotipagem (Figura 20).



**Figura 20 - Histogramas de caracterização das células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea. (A) Células “convencionais” expandidas em frascos de cultura utilizando meios de cultura *Dulbecco’s modified eagle medium*, suplementado com 10% de soro fetal bovino. (B) Células “inovadoras” expandidas em ambiente agitado e com microcarregadores, utilizando o meio StemPro® MSC SFM XenoFree.**

Imunofenotipagem das CEM avaliada por citometria de fluxo. A percentagem (%) apresentada no canto superior direito de cada histograma indica a expressão de cada antígeno. O painel do lado superior esquerdo representa o *gating* em SSC/FSC da população total de CEM.

### 3.3 Grupo controlo vs. grupo de receptores de células

Compararam-se os 6 animais do grupo controlo, com os 12 animais que receberam CEM (6 animais do grupo Convencionais + 6 animais do grupo Inovadoras). Os resultados da avaliação hemodinâmica durante os três cateterismos estão apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13 - Peso e parâmetros hemodinâmicos de base (D0), 7 dias após o enfarte agudo do miocárdio (D7 pós-EAM), pós-infusão intracoronária (Pós-IC) e 4 semanas após a infusão (D28 pós-IC) nos animais do grupo Controlo ( $n_1=6$ ) e nos animais que receberam células ( $n_2=12$ ). Médias e desvio padrão, diferenças avaliadas com o teste Mann-Whitney U.**

		CONTROLO	CÉLULAS	P
<b>D0</b>	Peso (kg)	31,2 ± 1	31,8 ± 1	0,42
	Freq. cardíaca (bpm)	104 ± 8	104 ± 5	0,815
	Pressão aórtica sistólica (mmHg)	88 ± 3	87 ± 3	1
	PTDVE (mmHg)	9,3 ± 1,4	6 ± 0,9	0,067
<b>D7 pós-EAM</b>	Peso (kg)	32 ± 1	33 ± 1	0,286
	Freq. cardíaca (bpm)	121 ± 5	108 ± 6	0,16
	Pressão aórtica sistólica (mmHg)	85 ± 4	85 ± 4	1
	PTDVE (mmHg)	12 ± 1	11,4 ± 0,4	0,401
<b>Pós-IC</b>	Freq. cardíaca (bpm)	142 ± 5	132 ± 10	0,72
	Pressão aórtica sistólica (mmHg)	81 ± 7	84 ± 3	0,584
	PTDVE (mmHg)	11,8 ± 1,3	12,4 ± 0,5	0,703
<b>D28 pós-IC</b>	Peso (kg)	47 ± 2	50 ± 1	0,239
	Freq. cardíaca (bpm)	113 ± 5	100 ± 4	0,083
	Pressão aórtica sistólica (mmHg)	93 ± 3	95 ± 3	0,75
	PTDVE (mmHg)	11,8 ± 0,8	11,8 ± 0,7	0,884

EAM – enfarte agudo do miocárdio. Freq - frequência. PTDVE – pressão telediastólica do ventrículo esquerdo.

Mais uma vez não houve diferenças nos parâmetros de base entre o grupo Controlo e o que recebeu CEM.

À semelhança do ocorrido na Segunda Fase, não houve alterações significativas da frequência cardíaca, da pressão telediastólica do ventrículo esquerdo e da pressão sistólica da aorta, na avaliação de base, na indução do EAM, durante a administração de CEM e na última avaliação às 4 semanas após administração das CEM (5 semanas após o EAM). Durante todos os procedimentos da entrega intracoronária de CEM não houve elevação do segmento ST ou disritmias ventriculares na avaliação eletrocardiográfica e todos os animais mantiveram fluxo TIMI 3 nas angiografias efetuadas após as infusões.

Os valores médios da RFC e do IMR estão apresentados na Tabela 14 e 15, respetivamente).

**Tabela 14 - Valores da reserva de fluxo coronário de base (D0), 7 dias após o enfarte agudo do miocárdio (D7 pós-EAM), pós-infusão intracoronária (Pós-IC) e 4 semanas após a infusão (D28 pós-IC) nos animais do grupo Controlo (n<sub>1</sub>=6 ) e nos animais que receberam células (n<sub>2</sub>=12).** Médias e desvio padrão, diferenças avaliadas com o teste Mann-Whitney U.

RFC	CONTROLO	CÉLULAS	P
DO	4,6 ± 1,2	4,5 ± 0,3	0,64
D7 pós-EAM	2,3 ± 0,5	3 ± 0,6	0,454
Pós-IC 1 <sup>o</sup> dose	0,82 ± 0,02	0,77± 0,04	0,47
Pós-IC 2 <sup>o</sup> dose	4,4 ± 1,7	2,1± 0,1	0,386
Pós-IC 3 <sup>o</sup> dose	3,1 ± 0,6	2 ± 0,2	0,112
Pós-IC – 30 min.	6,4 ± 2,7	2,4 ± 0,3	0,061
D28 pós-IC	3,6 ± 0,6	4,5 ± 0,8	0,512

EAM – enfarte agudo do miocárdio. RFC - reserva de fluxo coronário.

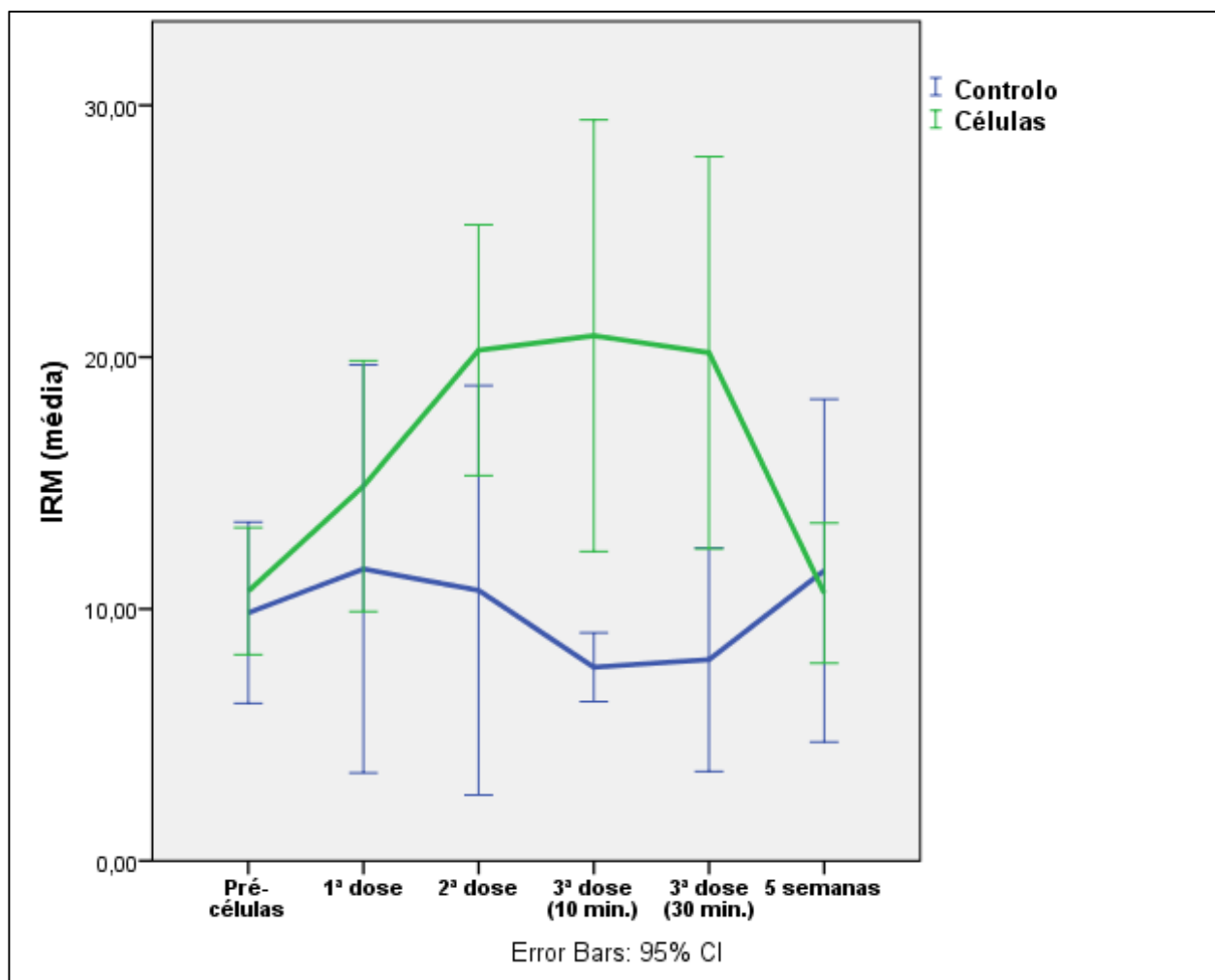
A RFC de base e pós-EAM foram semelhantes entre os dois grupos. Após a infusão intracoronária não se observaram diferenças significativas da RFC, tendo havido uma redução no grupo CEM (embora associada também a uma elevação no grupo Controlo), que quase alcançou significado estatístico aos 30 minutos após a administração da 3ª dose.

**Tabela 15 - Valores do índice de resistência da microcirculação de base (D0), 7 dias após o enfarte agudo do miocárdio (D7 pós-EAM), pós-infusão intracoronária (Pós-IC) e 4 semanas após a infusão (D28 pós-IC) nos animais do grupo Controlo (n<sub>1</sub>=6) e nos animais que receberam células (n<sub>2</sub>=12).** Médias e desvio padrão, diferenças avaliadas com o teste Mann-Whitney U.

<b>IRM</b>	<b>CONTROLO</b>	<b>CÉLULAS</b>	<b>P</b>
D0 (U)	8,4 ± 0,7	8,3 ± 0,5	0,639
D7 pós-EAM (U)	9,6 ± 1,1	10,7 ± 1,1	0,512
Pós-IC 1ªdose (U)	10,9 ± 2,5	15,9 ± 2,3	0,303
Pós-IC 2ªdose (U)	<b>10,2 ± 2,5</b>	<b>20,3 ± 2,3</b>	<b>0,034</b>
Pós-IC 3ªdose (U)	<b>7,5 ± 0,4</b>	<b>20,9 ± 3,9</b>	<b>0,011</b>
Pós-IC - 30 min. (U)	<b>7,6 ± 1,4</b>	<b>20,2 ± 3,5</b>	<b>0,015</b>
D28 pós-IC (U)	11,5 ± 2,5	10,7 ± 1,3	0,598

EAM – enfarte agudo do miocárdio. IRM- índice de resistência da microcirculação.

Quanto ao IRM, observou-se uma elevação expressiva nos animais que receberam células. Em relação ao valor sete dias após o EAM (D7 pós-EAM), o IRM aumentou 49% com a 1ª dose; 90% com a 2ª dose; e 95% com a 3ª dose. Estas diferenças alcançaram significado estatístico a partir da 2ª dose. Na avaliação efetuada às 4 semanas após a infusão (5 semanas após o EAM) houve uma descida para valores sobreponíveis aos do grupo Controlo (Figura 21).



**Figura 21 - Evolução do índice de resistência da microcirculação no grupo controle ( $n_1=6$ ) e no grupo que recebeu células ( $n_2=12$ ). Médias e desvio padrão.**

IRM- índice de resistência da microcirculação.

### 3.4 Três grupos (Controlo, Convencionais e Inovadoras)

Compararam-se os 6 animais do grupo controlo, com os 6 animais do grupo Convencionais e os 6 animais do grupo Inovadoras. Os resultados da avaliação hemodinâmica durante os três cateterismos estão apresentados nas Tabelas 16, 17 e 18. Os três grupos foram sobreponíveis não apresentando diferenças com significado nestas variáveis. Destaca-se que



não se observou nenhuma deterioração hemodinâmica durante a administração intracoronária das CEM, nem nenhuma tendência para benefício às 4 semanas pós-infusão das células.

**Tabela 16 - Peso e parâmetros hemodinâmicos de base (D0) e pós-indução do EAM (D0 pós EAM), nos animais do grupo controlo (n=6), do grupo de células convencionais (n=6) e do grupo de células inovadoras (n=6). Médias e desvio padrão, diferenças avaliadas com o teste *Kruskal-Wallis*.**

		CONTROLO	CONVENCIONAIS	INOVADORAS	P
	Peso (kg)	31,2 ± 1	32,3 ± 1	31,2 ± 1	0,503
D0	Freq. cardíaca (bpm)	104 ± 8	102 ± 9	105 ± 5	0,828
	Pressão AoS (mmHg)	88 ± 3	90 ± 2	84 ± 5	0,621
	PTDVE (mmHg)	9,3 ± 1,4	5,7 ± 1,1	6,3 ± 1,6	0,177
	Freq. Cardíaca (bpm)	142 ± 5	137 ± 16	128 ± 12	0,164
D0 Pós-EAM	Pressão AoS (mmHg)	75 ± 4	81 ± 5	88 ± 8	0,421
	PTDVE (mmHg)	11,8 ± 1,3	13 ± 0,5	11,8 ± 0.9	0,157

Freq.- frequência; EAM – enfarte agudo do miocárdio. AoS – aórtica sistólica. PTDVE – pressão telediastólica do ventrículo esquerdo.

**Tabela 17 - Peso e parâmetros hemodinâmicos no segundo cateterismo, 7 dias após indução do enfarte agudo do miocárdio (D7 pós-EAM) e após infusão intracoronária (Pós-IC) nos animais do grupo controlo (n=6), do grupo de células convencionais (n=6) e do grupo de células inovadoras (n=6). Médias e desvio padrão, diferenças avaliadas com o teste *Kruskal-Wallis*.**

		CONTROLO	CONVENCIONAIS	INOVADORAS	P
	Peso (kg)	32 ± 1	33,7 ± 1	32,8 ± 1	0,469
D7 Pós-EAM	Freq. cardíaca (bpm)	121 ± 5	101 ± 11	114 ± 6	0,22
	Pressão AoS (mmHg)	85 ± 4	81 ± 6	89 ± 5	0,622
	PTDVE (mmHg)	12 ± 1	11,7 ± 0,8	11,2 ± 0,4	0,499
Pós-IC	Freq. cardíaca (bpm)	142 ± 5	137 ± 16	128 ± 12	0,83
	Pressão AoS (mmHg)	81 ± 7	87 ± 3	82 ± 5	0,753
	PTDVE (mmHg)	11,8 ± 1,3	13 ± 0,5	11,8 ± 0,9	0,555

IC – infusão intracoronária. Freq.- frequência. AoS – aórtica sistólica. PTDVE – pressão telediastólica do ventrículo esquerdo.

**Tabela 18 - Peso e parâmetros hemodinâmicos no terceiro cateterismo (5 semanas após indução do enfarte e 4 semanas após infusão intracoronária) nos animais do grupo controlo (n=6), do grupo de células convencionais (n=6) e do grupo de células inovadoras (n=6). Médias e desvio padrão, diferenças avaliadas com o teste *Kruskal-Wallis*.**

	CONTROLO	CONVENCIONAIS	INOVADORAS	P
Peso (kg)	47 ± 2	49 ± 2	51 ± 2	0,486
Freq. cardíaca (bpm)	113 ± 5	96 ± 7	104 ± 6	0,153
Pressão aórtica sistólica (mmHg)	93 ± 3	99 ± 4	91 ± 4	0,388
PTDVE (mmHg)	11,8 ± 0,8	12,7 ± 1	10,8 ± 0,9	0,301

Freq.- frequência. PTDVE – pressão telediastólica do ventrículo esquerdo.

Os valores médios da RFC e do IMR estão apresentados na Tabela 19 e 20, respectivamente.

**Tabela 19 - Valores da reserva de fluxo coronário de base (D0), 7 dias após o enfarte agudo do miocárdio (D7 pós-EAM), pós-infusão intracoronária (Pós-IC) e 4 semanas após a infusão (D28 pós-IC) nos animais do grupo Controle (n=6 ), do grupo de células convencionais (n=6 ) e do grupo de células (n=6 ).** Médias e desvio padrão, diferenças avaliadas com o teste *Kruskal-Wallis*.

RFC	CONTROLO	CONVENCIONAIS	INOVADORAS	P
D0	4,6 ± 1,2	4,2 ± 0,4	4,8 ± 0,6	0,7
D7 pós-EAM	2,3 ± 0,5	2,9 ± 0,5	3,1 ± 1,2	0,567
Pós-IC 1ªdose	0,82 ± 0,02	0,85 ± 0,03	0,7 ± 0,05	0,134
Pós-IC 2ªdose	4,4 ± 1,7	2,1 ± 0,2	2,1 ± 0,2	0,682
Pós-IC 3ªdose	3,1 ± 0,6	2,0 ± 0,4	2,0 ± 0,2	0,278
Pós-IC - 30 min.	6,4 ± 2,7	2,1 ± 0,3	2,8 ± 0,4	0,069
D28 pós-IC	3,6 ± 0,6	3,4 ± 0,8	5,6 ± 1,2	0,372

EAM – enfarte agudo do miocárdio. RFC - reserva de fluxo coronário.

Mais uma vez não se observaram diferenças significativas da RFC entre os grupos durante todo o estudo. Nos três conjuntos de animais houve uma descida marcada da RFC após a infusão da 1ª dose, seguida de uma recuperação nas avaliações seguintes, menos marcada nos animais que receberam CEM.

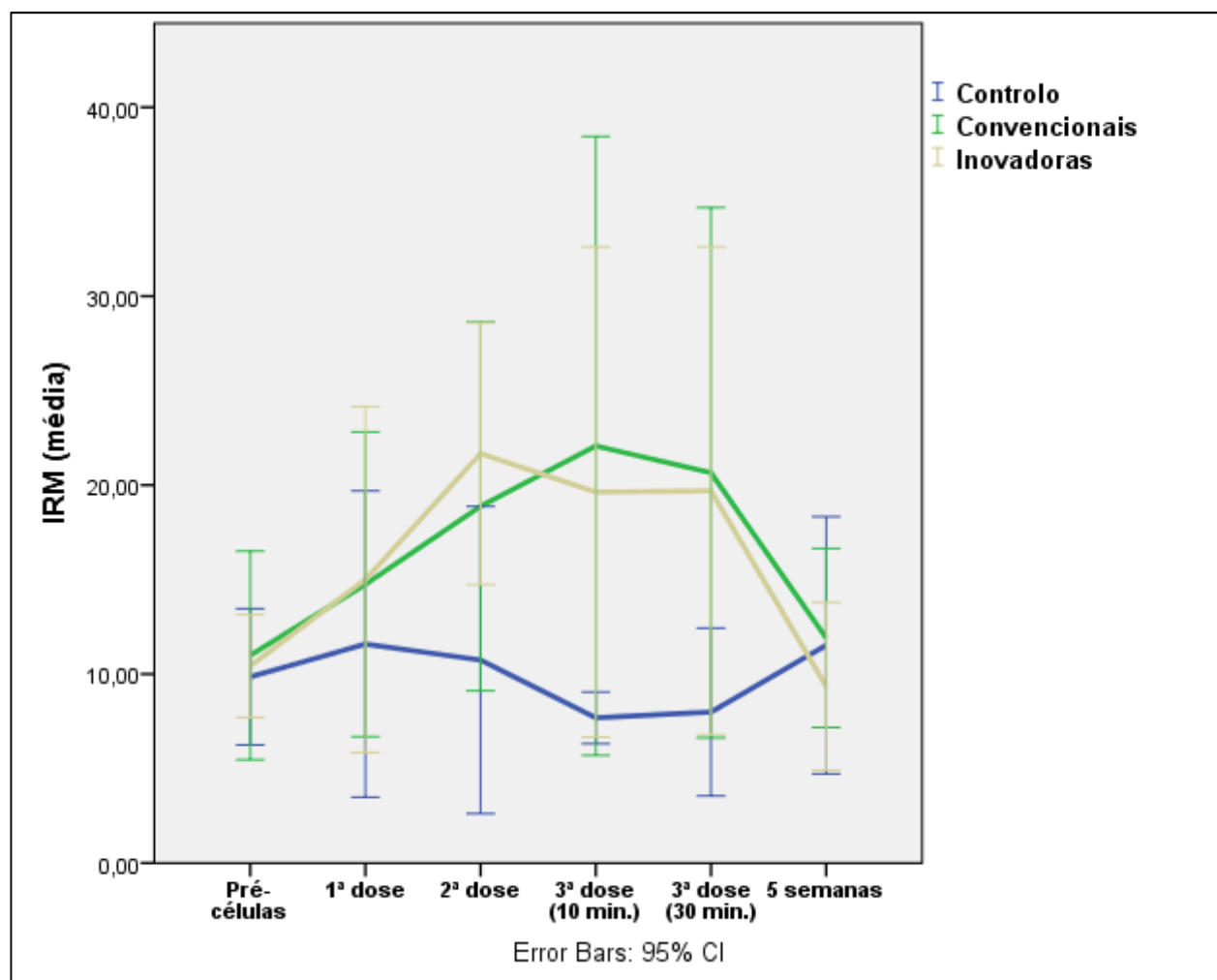
**Tabela 20 - Valores do índice de resistência da microcirculação de base (D0), 7 dias após o enfarte agudo do miocárdio (D7 pós-EAM), pós-infusão intracoronária (Pós-IC) e 4 semanas após a infusão (D28 pós-IC) nos animais do grupo Controlo (n=6 ), do grupo de células convencionais (n=6 ) e do grupo de células (n=6 ). Médias e desvio padrão, diferenças avaliadas com o teste *Kruskal-Wallis* (n=6).**

<b>IRM</b>	<b>CONTROLO</b>	<b>CONVENCIONAIS</b>	<b>INOVADORAS</b>	<b>P</b>
D0	8,4 ± 0,7	7,6 ± 0,8	9,0 ± 0,3	0,182
D7 pós-EAM (U)	9,6 ± 1,1	11,0 ± 2,2	10,4 ± 1,1	0,778
Pós-IC 1ªdose (U)	10,9 ± 2,5	14,8 ± 3,1	15,0 ± 3,6	0,548
Pós-IC 2ªdose (U)	<b>10,2<sup>a</sup> ± 2,5</b>	<b>18,9<sup>b</sup> ± 3,8</b>	<b>21,7<sup>b</sup> ± 2,7</b>	<b>0,034</b>
Pós-IC 3ªdose (U)	<b>7,5 ± 0,4</b>	<b>22,1<sup>b</sup> ± 6,4</b>	<b>19,6<sup>b</sup> ± 5,0</b>	<b>0,024</b>
Pós-IC – 30 min. (U)	<b>7,6<sup>a</sup> ± 1,4</b>	<b>20,7<sup>b</sup> ± 5,5</b>	<b>19,7<sup>b</sup> ± 5,0</b>	<b>0,049</b>
D28 pós-IC (U)	11,5 ± 2,5	11,9 ± 1,8	9,4 ± 1,7	0,603

EAM – enfarte agudo do miocárdio. IRM – índice de resistência da microcirculação. (<sup>a,b</sup>): letras diferentes na mesma linha P< 0,05

O aumento do IRM nos animais que receberam células verificou-se a partir da 1ª dose e com a mesma expressão nos dois grupos, Convencionais e Inovadoras, mas só atingiu significado estatístico após a 2ª dose (Figura 22). Nos animais que receberam células Convencionais e em relação ao valor de base pós-EAM o IRM aumentou: 35% com a 1ª dose; 72% com a 2ª dose; e 100% com a 3ª dose. No grupo das células Inovadoras o aumento foi de: 44% com a 1ª dose; 108% com a 2ª dose; e 88% com a 3ª dose.

No final do estudo, observou-se a descida do IRM para valores sobreponíveis aos do grupo Controlo e aos valores pós-EAM nos dois grupos que receberam células.



**Figura 22 – Evolução do índice de resistência da microcirculação no grupo Controlo, no grupo de células Convencionais e no grupo de células Inovadoras.**

Médias e desvio padrão (n=6).

IRM- índice de resistência da microcirculação.

### 3.5 Avaliação intragrupo

Foi avaliada a evolução do IRM dentro de cada grupo durante a entrega intracoronária de CEM no segundo cateterismo. Houve uma diferença com

significado no grupo que recebeu células Convencionais  $\chi^2(2) = 11,33$ ,  $p=0,023$ . Nos grupos Inovadoras e Controlo não houve diferenças com significado, embora o primeiro se tenha aproximado do nível de significância, respetivamente:  $\chi^2(2) = 8,98$ ,  $p=0,062$  e  $\chi^2(2) = 3,4600$ ,  $p=0,484$ .

A análise *post hoc* com o teste de Wilcoxon detectou diferenças entre o IRM antes da administração das células convencionais e após a 2ª dose e a 3ª dose ( $Z = -2,201$ ,  $p=0,028$ , em ambos). Devido à pequena dimensão da amostra optou-se por não utilizar a correção de Bonferroni.

### 3.6 Avaliação anatomopatológica

A presença de uma região de enfarte foi confirmada em todos os animais (Figuras 23).

**Figura 23 – Coração de suíno ao qual foi realizada a infusão de células estaminais inovadoras, sete dias após a indução do enfarte e que foi eutanasiado ao 36º dia. A zona afetada está bem evidenciada pela coloração pálida e retração da parede do ventrículo esquerdo.**





**Figura 24 – Cortes transversais de coração de suíno ao qual foi realizada a infusão de células estaminais inovadoras, sete dias após a indução do enfarte e que foi eutanasiado ao 36º dia (mesmo coração da Figura 23). A atrofia da parede do ventrículo esquerdo é evidente nos 2º e 3º cortes.**

O estudo anatomopatológico efetuado 4 semanas após a infusão intracoronária das CEM não revelou diferenças com significado entre o grupo Controlo e o conjunto dos animais que receberam células (Tabelas 21) e também entre os três grupos (Tabela 22). O estágio evolutivo da evolução do enfarte variou entre 9 e 12, sem diferenças apreciáveis entre os três grupos (Figura 25).

**Tabela 21 - Valores da espessura da parede na zona de atrofia, da dimensão transversal do coração, da razão espessura / dimensão transversal e do número de capilares observados, nos animais do grupo controlo ( $n_1=6$ ) e nos animais que receberam células ( $n_2=12$ ). Médias e desvio padrão, diferenças avaliadas com o teste**

	CONTROLO	CÉLULAS	P
Espessura (mm)	$0,83 \pm 0,7$	$0,7 \pm 0,5$	0,851
Dimensão transversal (mm)	$6,5 \pm 1,3$	$6,3 \pm 0,1$	0,779
Espessura / Dimensão transversal	$0,13 \pm 0,11$	$0,16 \pm 0,18$	0,574
Nº de Capilares	$17,15 \pm 2,0$	$15,7 \pm 2,0$	0,542

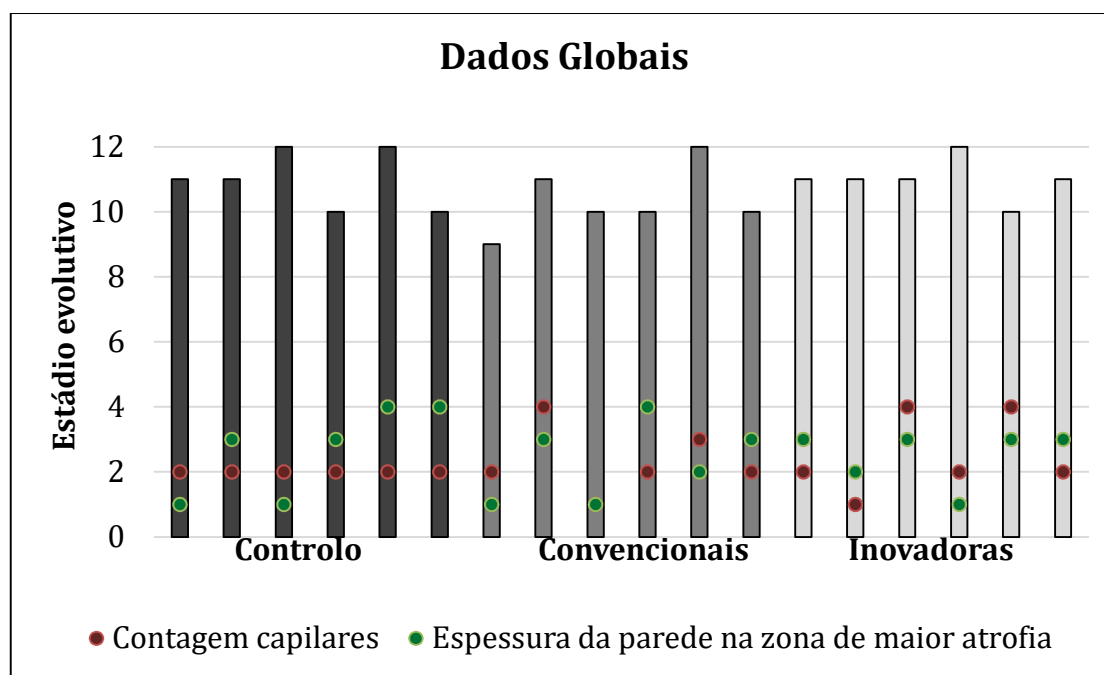
*Kruskal-Wallis.*

**Tabela 22 - Valores da espessura da parede na zona de atrofia, da dimensão transversal do coração, da razão espessura / dimensão transversal e do número de capilares observados nos animais do grupo controlo ( $n=6$ ), do grupo de células convencionais ( $n=6$ ) e do grupo de células inovadoras ( $n=6$ ). Médias e desvio padrão, diferenças avaliadas com o teste *Kruskal-Wallis*.**

	CONTROLO	CONVENCIONAIS	INOVADORAS	P
Espessura (mm)	$0,83 \pm 0,7$	$0,8 \pm 0,6$	$0,62 \pm 0,4$	0,977
Dimensão transversal (mm)	$6,5 \pm 1,3$	$6,3 \pm 1,2$	$6,3 \pm 0,77$	0,949
Espessura / Dimensão transversal	$0,13 \pm 0,11$	$0,13 \pm 0,09$	$0,2 \pm 0,24$	0,778
Nº de Capilares	$17,15 \pm 2,0$	$15,4 \pm 3,1$	$15,9 \pm 6,9$	0,685



**Figura 25 – Estádio evolutivo das alterações histológicas da região de enfarte do miocárdio.** Dados apresentados por cada animal. Número de capilares e espessura da parede representados por pontos..



No estudo com microscopia de fluorescência o corante fluorescente PKH26 (Sigma Aldrich) revelou-se inespecífico, tendo-se observado muita marcação com eventual origem em restos de hemáceas fagocitadas por macrófagos, como em mioglobina igualmente fagocitada na sequência da destruição dos cardiomiócitos. Desta forma, não foi possível a pesquisa das CEM de forma fidedigna.



# Discussão

---



### VII. DISCUSSÃO

---

#### 1. Primeira Fase

São vários os motivos que tornam o estudo da microcirculação cardíaca cada vez mais pertinente. É nos pequenos vasos que se encontram importantes limitações à terapêutica de revascularização percutânea, bem representadas no *no-reflow* coronário ou na manutenção de isquemia miocárdica após intervenção nos vasos epicárdicos, sobretudo no contexto de enfarte agudo do miocárdio <sup>362</sup>. É também na microcirculação que residem os processos fisiopatológicos de várias doenças cardíacas, desde o síndrome X <sup>363</sup> à mal definida cardiomiopatia de stress ou o síndrome de Takotsubo <sup>364</sup>. Por outro lado, existem novas estratégias terapêuticas em estudo para o tratamento das doenças cardíacas, como a Terapia Génica ou a Terapia Celular, que têm efeitos nos pequenos vasos, por estimularem a angiogénese ou por utilizarem a via intracoronária para administração de células <sup>336,365</sup>.

O estabelecimento de um modelo pré-clínico para o estudo da microcirculação é importante neste contexto, permitindo avaliar o efeito ou as limitações das terapêuticas atuais ou futuras. A vascularização cardíaca do porco é a que se aproxima mais da humana, apresentando uma anatomia coronária com morfologia e dimensões semelhantes, mesmo quanto ao diâmetro dos capilares <sup>366</sup>. Sendo um animal de utilização doméstica, acessível e de fácil manuseio, o porco tornou-se no modelo animal de eleição para os estudos pré-clínicos da microcirculação cardíaca.

O estudo da resistência da microcirculação é realizado durante uma fase de dilatação máxima da árvore coronária, conseguida farmacologicamente

através da administração de vasodilatadores da microcirculação, e reflete a capacidade máxima existente para aumentar o fluxo coronário recrutando toda a rede circulatória disponível. Embora a adenosina seja o fármaco mais divulgado na prática clínica, pela sua segurança, os estudos pré-clínicos têm privilegiado a papaverina intracoronária. A papaverina é mais eficaz que a adenosina <sup>367</sup>, sendo que esta última pode ter também limitações na sua capacidade vasodilatadora em animais de grande porte <sup>368</sup>.

A dose de papaverina utilizada nos estudos tem variado entre os 5 mg e os 20 mg (sendo esta última habitualmente usada no ser humano), não estando ainda definida qual a dose ideal ou se estas influenciam com significado a determinação do IRM. No nosso trabalho a dose menor de 5 mg teve um efeito semelhante à dose superior de 10 mg, quanto à descida da pressão distal e ao valor de IRM determinado. A dose superior mostrou-se igualmente segura, não se associando a instabilidade hemodinâmica ou elétrica. Como a correta determinação do IRM depende da indução de hiperemia máxima, ou seja da administração intracoronária da quantidade suficiente de fármaco, e podendo esta ser influenciada pela seletividade ou estabilidade do próprio cateter, será razoável supor que a dose de 10 mg pode ser a que garante uma melhor uniformidade dos resultados e aquela a utilizar sistematicamente.

O IRM foi validado num modelo suíno por Fearon *et al.* <sup>343</sup>. Utilizando 9 animais observaram um IRM médio de  $16,9 \pm 6,5$  U após indução de hiperemia com injeção intracoronária de 20 mg de papaverina. Este valor é ligeiramente mais elevado do que o obtido na nossa população, o que poderá estar relacionado com a manipulação cirúrgica da descendente anterior a que os animais foram sujeitos nesse estudo. Por outro lado, o valor médio do IRM na nossa população é semelhante ao de 12,6 U, recentemente descrito por Solberg *et al.* em humanos saudáveis <sup>346</sup>. Outro aspeto a ter em conta é a importância da correção do IRM com a pressão de encravamento coronário no contexto de doença da circulação epicárdica e da existência de circulação colateral <sup>369</sup>, o que não acontecia com o nosso modelo animal.

Apesar das vantagens do IRM, a sua determinação depende de uma metodologia consistente, que cuide da correta calibração e posicionamento do guia de pressões, da indução eficaz da hiperemia máxima, da injeção intracoronária do soro fisiológico à temperatura ambiente e da interpretação das curvas termodiluição durante a fase de fluxo máximo. A curta existência do IRM e a sua utilização por um número ainda limitado de investigadores leva que nem todos estes aspetos metodológicos estejam esclarecidos ou definidos.

A avaliação da evolução temporal das variáveis hemodinâmicas após a injeção da papaverina tem implicações práticas importantes. O IRM poderá ser útil no estudo do efeito imediato na microcirculação de várias terapêuticas, sendo relevante saber quando é que ocorre o regresso às condições hemodinâmicas basais. No nosso estudo o IRM deixou de ter diferenças significativas aos 5 minutos após a injeção de papaverina, em ambas as doses. Desta forma, é aconselhável que qualquer intervenção planeada para ser realizada em condições basais seja efetuada depois deste intervalo de tempo. Os nossos resultados apontam também para uma variabilidade interindividual do tempo em que ocorre a hiperemia máxima, com a maioria dos animais, mas não todos, a apresentar esta resposta no primeiro minuto. É necessário ter presente esta variabilidade e efetuar várias séries de medições do tempo de trânsito até ocorrer um nadir, o qual corresponderá ao verdadeiro IRM, caso contrário este poderá ser sobrevalorizado.

Os capilares coronários têm um diâmetro médio de 10  $\mu\text{m}$  (5-20  $\mu\text{m}$ )<sup>322</sup>. A injeção intracoronária de microesferas com 40  $\mu\text{m}$  compromete previsivelmente a microcirculação ao obstruir a circulação a jusante das pequenas arteríolas. No nosso estudo utilizou-se a quantidade de microesferas que permite manter o fluxo coronário, evitando o fenómeno de *no reflow*, o que na nossa experiência ocorre com doses superiores. A consistente e significativa elevação observada do IRM após a obstrução da microcirculação, estando o fluxo do vaso epicárdico livre de compromisso,

demonstra bem a capacidade deste método e o valor do IRM na avaliação do estado da microcirculação coronária.

A determinação do IRM baseia-se numa metodologia complexa, o que obriga ao refinamento prévio da técnica. Para manter uma baixa variância das suas determinações existem alguns aspetos importantes a ter em consideração. Além do óbvio, como a seletividade da cateterização coronária, a cuidada equalização das pressões, a constância da velocidade das injeções de soro fisiológico, o correto posicionamento do fio de pressões, o cuidado na indução e na escolha do momento de hiperemia máxima, encontramos na nossa experiência fatores ainda não descritos que influenciam ou inviabilizam a determinação do IRM. Os vasos epicárdicos do porco (com o peso habitualmente utilizado em investigação), são de menor calibre, dificultando a navegação com o fio de pressões, sendo frequente dobrar a sua ponta *floppy*. As determinações efetuadas com a ponta do fio dobrada resultam em valores de IRM incorretos e anormalmente elevados. Outras vezes, apesar do fio estar direito, a sua ponta está presa ou encostada a um pequeno vaso, levando o fio a fazer uma dobra durante a sístole, o que se traduz numa maior variabilidade das curvas tempo/temperatura obtidas com a injeção intracoronária de soro, comprometendo a determinação correta do IRM. É pois fundamental manter o fio de pressões direito e livre dentro da coronária, sendo que para tal, o nosso grupo passou a utilizar um microcateter previamente introduzido na descendente anterior com um fio *standart* (ex. BMW) como a forma mais rápida e eficaz de colocar o guia de pressões sem ter uma curva excessiva na sua ponta. A descrição e publicação de todos os pormenores ou soluções que possam contribuir para uma melhoria da técnica é essencial para o seu refinamento e deve ser encorajada nos trabalhos que utilizem o IRM.



## 2. Segunda Fase

Como já referido, as CEM mostraram em estudos pré-clínicos a sua capacidade de se fixar no coração, de reduzir as dimensões de enfarte e de melhorar a função ventricular esquerda, em roedores <sup>370,371</sup> e em modelos animais de grande porte <sup>163,372</sup>.

Existem poucos estudo clínicos com CEM. Destes destacam-se pela qualidade da sua metodologia o estudo de Hare *et al.* como o primeiro estudo controlado, duplamente cego a mostrar a segurança da administração intravenosa de CEM no contexto de EAM <sup>268</sup>, e o estudo multicêntrico de Bartunek *et al.*, em que as CEM foram injetadas por via transendocárdica em doentes com cardiomiopatia isquémica crónica, o que se revelou seguro e associou-se a uma tendência para existência de alguns benefícios clínicos <sup>373</sup>.

Contrariamente aos estudos com CEH, os principais ensaios clínicos com CEM evitaram a via intracoronária para a entrega das células. A via intracoronária permite uma maior fixação no coração das células transplantadas, em relação com a via intravenosa <sup>221</sup>. A comparação com a via intramiocárdica é mais controversa <sup>221,223</sup>, mas a favor da injeção intracoronária está o facto dos procedimentos coronários percutâneos fazerem parte da atividade clínica atual, com milhares de intervenções a serem realizadas diariamente por todo o mundo para o estudo ou tratamento de várias formas de doença cardíaca. A entrega de células por via intramiocárdica transendocárdica está dependente de técnicas mais complexas, com as quais os Cardiologistas de Intervenção não estão ainda familiarizados. Como já referido, o tamanho das CEM tem sido motivo de apreensão quanto à sua utilização por via intracoronária por receios quanto à ocorrência de obstrução microvascular <sup>224,225</sup>, microenfartes do miocárdio <sup>222</sup> e compromisso do fluxo coronário <sup>221</sup>. No entanto, alguns estudos recentes

parecem suportar a segurança e eventual benefício das CEM por via intracoronária<sup>374-375</sup>.

O aprisionamento de CEM na microcirculação e as suas consequências para o fluxo coronário estarão provavelmente dependentes de um efeito dose. No estudo exploratório de Grieve *et al.* com duas ovelhas, foi observada necrose miocárdica no animal que recebeu  $75 \times 10^6$  CEM, contudo, não houve evidência histológica de lesão miocárdica no animal injetado com  $25 \times 10^6$  de células<sup>224</sup>. Também utilizando o modelo suíno, Llano *et al.* observaram o fenómeno de *no-reflow* coronário e mortalidade precoce nos animais que receberam a dose de  $50 \times 10^6$  CEM<sup>376</sup>. No estudo com escalonamento de dose de Hong *et al.*, três porcos receberam, sucessivamente por via intracoronária na artéria descendente anterior, 1, 3, 10, 30 e  $100 \times 10^6$  de CEM derivas do tecido adiposo, com intervalos de 30 minutos<sup>377</sup>. O fluxo coronário epicárdico não foi comprometido até à dose cumulativa de  $14 \times 10^6$ , mas as injeções seguintes e após uma dose de  $44 \times 10^6$  CEM, associaram-se a uma diminuição progressiva do fluxo, que culminou em hipocinésia da parede anterior e do ápex do ventrículo esquerdo. Com estes dados presentes optámos por utilizar a dose para infusão de  $30 \times 10^6$  CEM. Esta poderá ser uma dose ajustada à utilização clínica, pois não se associa a complicações periprocedimento pois não se observou deterioração hemodinâmica, o surgimento de disritmias ou compromisso do fluxo intracoronário epicárdico.

No presente, nenhuma estratégia de entrega intracoronária de CEM se destacou como a mais adequada. Os estudos anteriores mencionados utilizaram na sua maioria o método de *stop-flow* como descrito por Strauer *et al.*<sup>230</sup>, com pequenas variações entre si. Teoricamente, esta metodologia pode prevenir a perda de células por fluxo retrógrado ou pelo seu rápido *washout* distal, apesar de não haver prova de que tal aconteça ou que mereça ser motivo de preocupação. Por outro lado, com a técnica de *stop-flow* é possível que as CEM se acumulem distalmente ao balão e, após a sua desinsuflação e retoma do fluxo coronário, cheguem à microcirculação em

grande número e em agregados, o que poderá contribuir para um efeito obstrutivo. Na nossa experiência, as CEM foram lentamente injetadas utilizando um microcateter e uma seringa de infusão, com um fluxo constante e sem oclusão coronária. Especulamos que a vantagem desta abordagem é que as CEM atingem a microcirculação a um ritmo menor e de forma regular, o que potencialmente previne ou minimiza a sua acumulação dentro dos microvasos. Os nossos resultados suportam uma maior segurança desta estratégia de infusão contínua das CEM com o fluxo coronário mantido.

De acordo com o nosso conhecimento, os trabalhos desta Segunda Fase, foram os primeiros a abordar os efeitos agudos na microcirculação cardíaca da injeção intracoronária de CEM, utilizando a avaliação do IRM e um desenho de estudo controlado e cego. A avaliação do IRM é baseada numa técnica complexa, tendo sido de extrema importância a validação no modelo suíno realizada na Primeira Fase.

Neste estudo a entrega intracoronária de CEM traduziu-se num aumento significativo do IRM para  $15,3 \pm 3$  U, mas não tão impressionante como o de  $41,3 \pm 16$  U observado nos trabalhos da Primeira Fase, onde foi realizada a injeção de  $30 \times 10^6$  de microesferas de embozene com um diâmetro de 40  $\mu\text{m}$ . Tal sugere a existência de diferentes níveis de obstrução da microcirculação, que podem ser distinguidos pela determinação do IRM. Esta capacidade poderá ser útil em estudos de dose-efeito futuros e no estabelecimento da dose ótima de CEM a ser utilizada por via intracoronária, tendo em conta a sua segurança.

Também foi observado um ligeiro aumento do IRM aos 5 minutos no grupo controlo, que motivou uma diferença com significado na análise intragrupo, o que poderá estar relacionado com a manipulação coronária durante a injeção da solução acelular, podendo interferir com a indução da hiperemia máxima, não sendo possível excluir a existência de fenómenos microembólicos motivados por pequenos trombos ou ar. Na verdade, apenas aos 30 minutos os dois grupos de animais estudados tiveram uma diferença significativa, o

que parece indicar que será importante incluir e utilizar avaliações mais tardias do IRM, e não apenas a sua determinação imediata após uma intervenção.

No presente momento o estudo de Hong *et al.* é o único que também aborda os efeitos na microcirculação coronária da injeção de células com avaliação do IRM<sup>377</sup>. Utilizando células CEM derivadas do tecido adiposo, os autores randomizaram 12 porcos num grupo controlo, em outro que recebeu células em dose baixa ( $10 \times 10^6$  células) e num último com dose alta ( $50 \times 10^6$  células). No grupo de dose alta reportaram um aumento significativo do IRM em relação ao valor basal ( $11 \pm 1,3$  vs.  $17,8 \pm 3,2$ ,  $p=0,04$ ). O mesmo não se verificou no grupo de dose baixa, o que vai novamente ao encontro da existência de um efeito dose dependente. Nesta fase do nosso trabalho, foi usada uma dose diferente de células, intermédia em relação às duas doses do estudo anterior e uma técnica de infusão diferente. Também estávamos cegos durante a avaliação do IRM, o que é uma importante vantagem metodológica ao evitar viés relacionados com o operador. No entanto, os nossos resultados estão em linha com os obtidos por Hong *et al.*, embora com uma diferença mais expressiva entre os grupos, o que confirma claramente a existência de um compromisso da microcirculação com a entrega intracoronária de CEM.

A RFC não se modificou e não houve diferenças significativas com o grupo controlo, o que demonstra que a circulação epicárdica não foi afetada durante a experiência e que o IRM é um parâmetro mais específico e sensível para a avaliação da microcirculação.

### 3. Terceira Fase

Os trabalhos desta fase permitiram-nos também a obtenção de dados sobre as alterações ocorridas 1 semana após o EAM. Além da esperada elevação da pressão telediastólica do ventrículo esquerdo, sinal de compromisso da

função ventricular resultante da perda de miocárdio funcionante, observou-se uma diminuição da RFC e uma elevação do IRM.

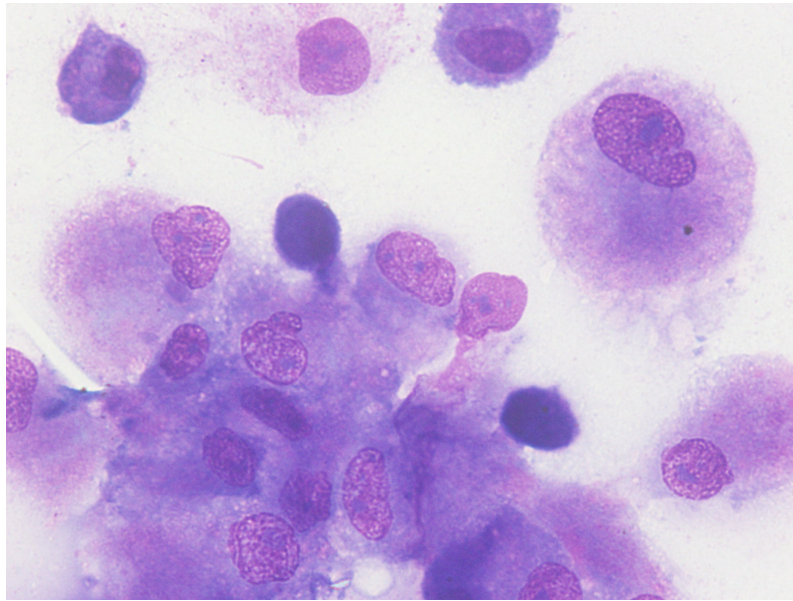
Em 2013 Koudstaal *et al.* avaliaram em 13 suínos as alterações da fisiologia coronária após enfarte <sup>378</sup>. Uma comparação directa dos resultados está impossibilitada por não terem determinado o IRM, mas sim a resistência microvascular hiperémica (RMh) baseada na avaliação da velocidade do fluxo coronário através do Doppler intracoronário. Neste estudo os autores reportaram um aumento da RMh de 28%, 4 semanas após o EAM ( $p=0,03$ ), semelhante ao aumento de 24% do IRM observado no nosso trabalho. Em discordância está o facto de não terem detetado alterações com significado da RFC (2,9 vs. 3,  $p=0,46$ ). Na avaliação histológica do coração dos animais os autores observaram uma diminuição significativa da densidade capilar na região de enfarte e um espessamento significativo da parede das arteríolas, o que permite explicar o aumento da resistência microvascular na avaliação *in vivo*.

Existem alguns trabalhos onde a avaliação da microcirculação na fase aguda do EAM foi realizada no ser humano, após a revascularização com angioplastia directa <sup>379-384</sup>. Estes trabalhos concordam no facto de existirem na maioria dos doentes uma diminuição da RFC e um aumento da resistência da microcirculação. A média da RFC observada variou entre 1 e 2,5 e a média do IRM foi de cerca de 35 a 40 U, semelhante à observada após a injeção das microesferas na Primeira Fase dos nossos trabalhos. O IRM neste contexto relacionou-se com a extensão de enfarte <sup>379</sup>, com a remodelação do ventrículo esquerdo <sup>381</sup> e com a progressão para insuficiência cardíaca e morte <sup>382</sup>.

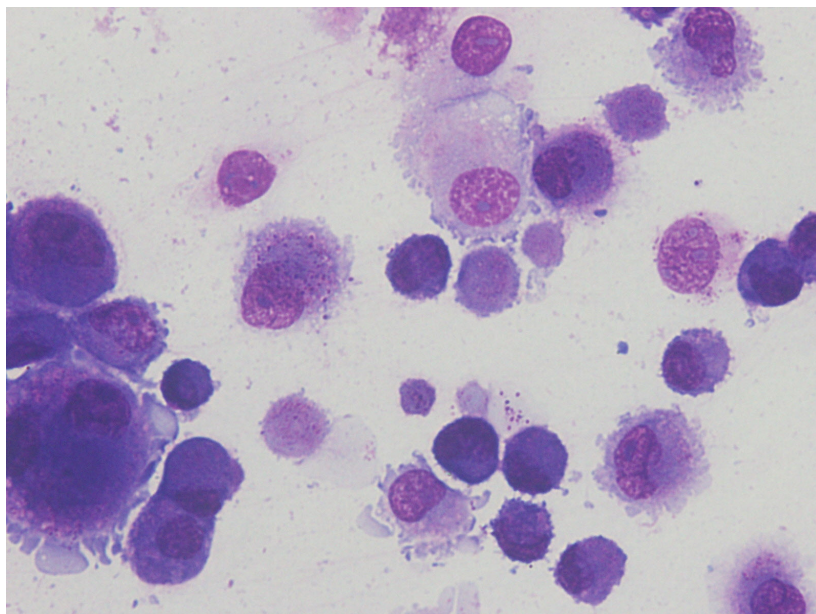
O IRM médio no nosso trabalho após o EAM foi de 10,3 U, consideravelmente menor do que nos estudos clínicos referidos. Além da possibilidade de variação inter-espécie e das diferenças em

comparar corações juvenis com o de doentes com várias comorbilidades, existem ainda dois fatores importantes que podem explicar esta diferença. Primeiro, o enfarte induzido pela oclusão prolongada da coronária não tem a carga trombótica e os fenómenos de embolização distal presentes na maioria dos doentes com EAM. Segundo, nos estudos clínicos a avaliação foi realizada na fase aguda, onde o IRM é mais elevado, havendo evidência que a microcirculação começa a recuperar logo após o primeiro dia, podendo apresentar valores normais aos 6 meses<sup>383</sup>.

A avaliação realizada das CEM confirmou as menores dimensões das células inovadoras, com um diâmetro médio cerca de 25% menor do que as convencionais, o que pode ser apreciado nas imagens de microscopia convencional (Figuras 25 e 26). A sua caracterização imunofenotípica foi consonante com a esperada para as células mesenquimais da medula óssea, com exceção da ligeira menor expressão de CD90 e a maior expressão de CD14+, acompanhada da quase nula de HLA-DR. Este último fenómeno pode ser o resultado da expressão de epítomos com reatividade cruzada para o CD14 e, como tal, representar um falso positivo<sup>385</sup>. De facto, esta marcação positiva de CD14 é incoerente com a inexistência do HLA-DR, pois se realmente houvesse uma população monocítica o HLA-DR também iria marcar positivamente.



**Figura 25 - Células estaminais convencionais utilizadas no estudo.** As células apresentam homogeneidade morfológica evidente, de citoplasma amplo e núcleo, por vezes, com chanfraduras de cromatina reticulada, contendo um nucléolo volumoso (Giemsa x1000).



**Figura 26 - Células estaminais inovadoras utilizadas no estudo.** As células têm dimensão muito heterogênea, com basofilia do citoplasma igualmente variável (Giemsa x1000).

Quando avaliamos os efeitos da infusão intracoronária das CEM, os dados desta fase dos trabalhos estão em linha e confirmam os resultados da Segunda Fase. Existem contudo importantes diferenças metodológicas a ter em conta, pois no segundo estudo foram utilizados animais saudáveis, sem compromisso de base da microcirculação e o número de células injetadas foi menor ( $30 \times 10^6$  contra um total cumulativo de  $45 \times 10^6$  na Terceira Fase).

Mais uma vez não houve alterações do fluxo coronário epicárdico na angiografia ou alterações electrocardiográficas motivadas pela entrega intracoronária das CEM. A injeção intracoronária de CEM revela-se segura quanto aos principais parâmetros que avaliam o compromisso agudo da perfusão miocárdica na prática clínica.

Nas duas fases não houve diferenças com significado da RFC e observou-se uma elevação significativa do IRM. Na Segunda Fase o IRM aos 30 minutos foi de 14,2 U e na Terceira foi de 20,2 U (dose cumulativa de  $45 \times 10^6$ ), correspondendo respetivamente a uma elevação de 112% e 95%.

Para o estudo do dose-efeito foram utilizadas uma dose de  $10 \times 10^6$ , uma segunda dose cumulativa de  $25 \times 10^6$ , próxima da número de células utilizado na Segunda Fase, e uma dose cumulativa de  $45 \times 10^6$ . A primeira e a terceira dose são semelhantes às utilizadas no estudo de Hong *et al.*<sup>377</sup>. No nosso trabalho observámos uma ligeira elevação do IRM após a infusão de  $10 \times 10^6$  de CEM, mas que não alcançou significado estatístico, à semelhança do que aconteceu nos 4 animais que receberam a mesma dose avaliados por Hong *et al.* Nesse estudo o IRM do grupo de dose alta ( $50 \times 10^6$ ), avaliado 7 dias após a infusão



de células, teve um aumento significativo de 62%, para um valor médio de 17,8 U. O IRM aos 30 minutos após infusão por nós observado foi de 20,2 U (dose cumulativa de  $45 \times 10^6$ ), o que corresponde a um aumento mais expressivo de 95%, mas que está relativamente de acordo, tendo em conta as diferenças entre os estudos quanto ao tipo de CEM utilizadas e ao *timing* de avaliação.

Os resultados do conjunto dos nossos trabalhos apontam para a capacidade do IRM em diferenciar vários níveis de compromisso da microcirculação. O aumento progressivo do IRM verificado com o incremento do número de células infundidas e também o maior valor médio de 41 U, obtido com a administração das microesferas na Primeira Fase, sugerem que é possível quantificar vários níveis de compromisso da microcirculação. Esta quantificação pode eventualmente ser feita de forma a obter um limiar, acima do qual a obstrução dos microvasos se traduz num compromisso da circulação epicárdica e em disfunção electromecânica do miocárdio. Como já referido, no trabalho de Hong *et al.* foi feita uma avaliação com escalonamento da dose de células em apenas 3 animais. Na dose cumulativa de  $44 \times 10^6$  houve um aumento do número de ciclos cardíacos necessário para observar a porção distal da descendente anterior e na dose cumulativa de  $144 \times 10^6$  o fluxo epicárdico ficou claramente comprometido, o que se acompanhou por hipocinésia do miocárdio em relação com a descendente anterior e fibrilhação ventricular nos 3 animais. Infelizmente, nesta parte do estudo não foi feita a determinação do IRM. Por outro lado, entre o valor de  $44 \times 10^6$  e o de  $144 \times 10^6$  existe uma vasta zona cinzenta por avaliar, onde provavelmente residirá o limiar de segurança para injeção intracoronária de CEM. O estudo em tempo real do estado da microcirculação com o IRM poderá ser uma ferramenta de grande

utilidade na determinação deste limiar, e os nossos trabalhos abrem espaço para a investigação nesse sentido.

Com o pressuposto da existência de modificações estruturais resultantes da aplicação de um protocolo inovador de expansão das CEM, que se traduzissem em diferenças quando aos seus efeitos na microcirculação, comparámos nesta fase dois tipos células.

Os parâmetros obtidos nos dois grupos de animais que receberam CEM foram semelhantes. As células inovadoras associaram-se de igual forma a uma elevação significativa do IRM, com uma curva ascendente semelhante, com exceção de um inesperado decréscimo do valor do IRM com a terceira dose. Os nossos resultados indicam que as células “inovadoras” não possuem diferenças nas suas características físicas, que permitam associá-las a um melhor perfil de segurança quanto à microcirculação, embora a sua estratégia de expansão possa ter outro tipo de vantagens. Apesar de as células inovadoras terem menores dimensões, apresentam outras diferenças estruturais na avaliação por microscopia, que podem eventualmente influenciar a sua capacidade de se adaptar aos microvasos coronários. Outra explicação pode residir simplesmente na diferença de dimensões não ser suficiente para ter impacto nos efeitos observados na microcirculação. Não existem trabalhos prévios que tentem comparar desta forma diferentes tipos de células quanto aos seus efeitos na microcirculação.

O terceiro cateterismo efetuado às 5 semanas após o EAM (4 semanas após a infusão das CEM), permitiu apreciar o estado da microcirculação já numa fase de resolução do enfarte. Uma elevação mantida do IRM em comparação com o grupo controlo, indicaria uma disfunção da microcirculação mantida e um eventual papel nocivo da entrega intracoronária das CEM, mesmo quando não existe uma alteração do

fluxo coronário epicárdico durante a sua infusão. Por outro lado, um valor menor do IRM seria um hipotético indicador da existência de neoangiogénese promovida pela Terapia Celular. Tal não se verificou no nosso estudo, onde os IRM dos três grupos convergiram no tempo para um valor semelhante, o que aponta para um efeito neutro na microcirculação nas semanas seguintes à infusão das CEM. No já referido estudo clínico HEBE, também a administração de CEH não se associou à recuperação da microcirculação avaliada pela RMh<sup>250</sup>.

A entrega intracoronária das CEM, através da técnica de infusão contínua, lenta e sem obstrução coronária, nas doses de  $30 \times 10^6$  e cumulativa de  $45 \times 10^6$  não se associou a nenhum efeito adverso durante a sua administração. Nenhum animal teve compromisso do fluxo coronário avaliado com a classificação de TIMI, instabilidade hemodinâmica ou alterações eletrocardiográficas, que pudessem ser associadas à administração das células, o que está de acordo com a segurança da sua utilização nas doses referidas. Ao sofrer alterações antes de qualquer outra evidência do efeito da administração intracoronária das CEM, o IRM surge como um parâmetro subclínico cuja avaliação poderá ser relevante e auxiliar a entrega segura destas células. Os nossos resultados abrem espaço para investigações futuras nesse sentido.

Apesar de vários estudos pré-clínicos terem demonstrado um efeito positivo das CEM na redução da cicatriz de enfarte, a nossa análise anatomopatológica não permitiu detetar diferenças nos animais que receberam células. Da mesma forma a avaliação histológica não detetou a presença de CEM após as 4 semanas. Outros estudos tiveram resultados semelhantes. Toma *et al.* também utilizaram o xenotransplante de CEM humanas para o coração de rato imunodeficiente e 4 dias após a injeção a maior parte das células foi

detetada no baço, pulmão e fígado e apenas uma minoria de 0,44% continuava presente no miocárdio <sup>171</sup>. Também no rato, Bogt *et al.* concluíram pela ocorrência da morte generalizada das CEM do dador, após a sua não detecção por bioluminescência 6 semanas após o transplante <sup>386</sup>. Num outro estudo, com a ovelha como modelo de EAM, foi feito o transplante alogénico por injeção direta nos bordos da região enfartada de  $25 \times 10^6$  a  $450 \times 10^6$  CEM <sup>387</sup>. A avaliação feita 1 hora após a entrega das células mostrou de forma evidente o sucesso do transplante, mas os autores não conseguiram identificar a sua presença 8 semanas depois, utilizando técnicas histológicas e de *Polimerase Chain Reaction*. Com um modelo animal semelhante ao utilizado por nós, Hashemi *et al.* entregaram por via endomiocárdica CEM nas doses de  $2,4 \times 10^7$ ,  $2,4 \times 10^8$ ,  $4,4 \times 10^8$ , 3 dias após a indução do enfarte <sup>388</sup>. Também não encontraram diferenças na espessura do enfarte e no número de capilares em relação ao grupo controlo. De igual modo, na avaliação por microscopia de fluorescência, efetuada 12 semanas após o transplante, não detetaram de forma inequívoca a presença de CEM no miocárdio.

Existem várias razões para a discrepância entre a evidência que nos chega de estudos negativos/neutros e dos estudos em que houve fixação das células, evidência de regeneração, diminuição das dimensões do enfarte e melhoria da função ventricular. Diferenças quanto à forma de expansão e manipulação das células, a utilização de diferentes modelos animais, dos tempos de entrega e da avaliação dos efeitos das células, podem contribuir de forma variável para a divergência dos resultados reportados. Não deixa de ser curioso que, apesar dos estudos negativos/neutros representarem claramente a minoria, não haja ainda de forma clara um consenso quanto à existência cabal de provas de regeneração miocárdica. De outra forma, a grande atenção da investigação atual esta focada na transformação e

melhoria das capacidades das células, de forma a se poder obter um efeito clínico claramente evidente com o seu transplante. Consequentemente, os nossos resultados estão de acordo com a existência de importantes insuficiências na terapia celular e com a necessidade de manter um esforço na investigação, que permita encontrar as soluções necessárias à implementação de estratégias terapêuticas baseadas na utilização das células que beneficiem os doentes, num futuro que se quer próximo.



## **Limitações do Estudo**

---





### **VIII. LIMITAÇÕES DO ESTUDO**

---

No nosso trabalho são reconhecidas algumas limitações, que devem ser consideradas na interpretação dos resultados obtidos.

Em primeiro lugar estão as inerentes à utilização do modelo animal. Embora tenha sido escolhido o modelo de grande porte considerado ideal para os nossos objetivos, existem diferenças inter-espécie que podem condicionar a extrapolação dos resultados para o ser humano. Por outro lado, foram utilizadas células humanas, o que pode condicionar o seu comportamento na microcirculação e a sua posterior sobrevivência (apesar dos animais estarem sob imunossupressão).

Na Primeira e Segunda fase foram utilizados animais saudáveis, o que apesar de ter sido uma opção correta para as avaliações a que nos propúnhamos, se afasta do cenário antecipado para a utilização clínica das CEM. Também nestas fases não nos foi possível ter o estudo histológico dos animais e confirmar dessa forma a presença da obstrução da microcirculação. Na Terceira Fase a avaliação histológica foi orientada para o estudo da fixação, sobrevivência e efeitos das CEM e foi realizado às 4 semanas após a entrega das CEM, não se conseguindo uma vez mais ter informação sobre os efeitos imediatos na microcirculação.

Apesar de termos utilizado uma técnica de infusão que nos parece mais adequada, não foi feita uma comparação lado-a-lado com a técnica mais divulgada de *stop-flow*. Qualquer diferença inferida quanto ao método de entrega das células necessita de confirmação em estudos futuros.

Tal como em outros estudos com avaliação da resistência da microcirculação no modelo animal, não foi feita a correção do IRM com a pressão de

encravamento coronário (Pw) nem com o valor da pressão venosa central (que é normalmente assumida como 0). Esta correção pode ser importante para a distinção do papel da circulação coronária colateral. Julgamos contudo, que na ausência de doença coronária e para a avaliação dos efeitos imediatos na microcirculação, a correção com a Pw não se justifica pois dificilmente alteraria os resultados e as conclusões. Na Terceira Fase, a indução do enfarte incluiu a reperfusão no final dos 90 minutos, não sendo evidente nem plausível a existência de circulação colateral que influenciasse os resultados obtidos às 4 semanas.

Seria interessante e relevante ter outros parâmetros que aferissem o estado da microcirculação e que pudessem ser correlacionados com o IRM. No entanto, a utilização do TIMI *frame count* e a gradação do *blush* miocárdico foram impossibilitados pela baixa resolução das imagens fluoroscópicas adquiridas e pela impossibilidade da sua gravação para estudo posterior. A melhoria do equipamento de angiografia é uma das nossas ambições para o futuro, de forma a ultrapassar estas limitações. Métodos de imagem não invasiva como a ressonância magnética, o PET ou a cintigrafia, permitiriam também uma avaliação morfo-funcional da microcirculação, mas a sua utilização ainda está longe do horizonte da investigação pré-clínica em Portugal.

A não utilização de marcadores bioquímicos de necrose miocárdica, como a troponina, não permite correlacionar as alterações da microcirculação observadas com a existência de microenfartes.

No nosso trabalho o estudo da função ventricular está limitado à avaliação dos parâmetros hemodinâmicos – pressão aórtica e pressão telediastólica do ventrículo esquerdo. A avaliação de outras variáveis relacionadas com a função ventricular acrescentaria valor à Terceira Fase, onde se procuraram efeitos do transplante das CEM e se compararam dois tipos de células. Mais uma vez, é uma forte pretensão do nosso grupo ultrapassar esta insuficiência com a aquisição de equipamento adequado.

Inerente a este tipo de estudo, exploratório e com modelo animal de grande parte, os números da nossa população são pequenos. Na Terceira Fase foi necessário assumir a distribuição não normal de algumas variáveis, pelo que se utilizou a estatística não paramétrica, com menor poder estatístico e sendo menos provável a rejeição da hipótese nula quando ela é falsa.



# Conclusões

---



### **IX. CONCLUSÕES**

---

A finalização dos nossos trabalhos permitiu verificar as hipóteses formuladas, além de ter fornecido outros dados que merecem ser considerados, por acrescentarem conhecimento ao campo em que esta tese se insere.

**A injeção intracoronária de CEM associa-se a uma obstrução da microcirculação, evidenciada pelo aumento imediato e mensurável do IRM.**

A avaliação com o IRM permite discernir a disfunção da microcirculação sem que haja evidência de compromisso da circulação epicárdica, alterações eletrocardiográficas ou deterioração do estado hemodinâmico.

Quanto à técnica de determinação do IRM no modelo animal utilizado, e tendo em conta algumas das indefinições previamente existentes, concluímos ainda que:

- a) a dose de 5 mg de papaverina é tão eficaz como a de 10 mg para a indução de hiperemia máxima;
- b) o retorno às condições hemodinâmicas semelhantes às basais ocorre 5 minutos após a injeção de papaverina;
- c) a própria manipulação intracoronária pode associar-se a uma elevação do IRM, se avaliado numa fase muito precoce, sendo importante aguardar um intervalo de tempo entre uma intervenção coronária e a sua determinação.

Estes aspetos devem ser considerados na elaboração de trabalhos que utilizem a avaliação do IRM.

**A avaliação da microcirculação com o IRM revela-se útil no estudo de efeito/dose na entrega intracoronária de CEM, mas não permite a comparação das células com propriedades físicas diferentes utilizadas.**

Com a determinação do IRM é possível quantificar diferentes níveis de disfunção da microcirculação. Essa capacidade pode ter interesse clínico se a investigação futura conseguir estabelecer limiares de segurança para a entrega intracoronária de células.

**No nosso modelo animal de EAM a injeção intracoronária de CEM não se associou a qualquer evidência de promoção da neoangiogénese ou restauração da microcirculação.**

No nosso estudo, a avaliação do IRM realizada 4 semanas após a entrega intracoronária das CEM não revela alterações passíveis de inferir um efeito positivo na neoangiogénese, o que também não se confirma no estudo histológico. Também não foi possível demonstrar a fixação e sobrevivência das CEM no tecido miocárdico.



# Bibliografia

---



### **X. BIBLIOGRAFIA**

---

1. Lopez AD, Murray CC. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med*. 1998 Nov;4(11):1241-3.
2. Go, A. S. et al. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 127, e6–e245 (2013).
3. Nichols M, Townsend N, Luengo-Fernandez R, Leal J, Gray A, Scarborough P, Rayner M (2012). European Cardiovascular Disease Statistics 2012. European Heart Network, Brussels, European Society of Cardiology, Sophia Antipolis
4. Mensah GA, Brown DW. An overview of cardiovascular disease burden in the United States. *Health Aff (Millwood)*. 2007 Jan-Feb;26(1):38-48.
5. Leal J, Luengo-Fernández R, Gray A, Petersen S, Rayner M. Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. *Eur Heart J*. 2006 Jul;27(13):1610-9.
6. Allender S, et al. European Cardiovascular Disease Statistics 2008. *European Heart Journal* 1773 (2008).
7. Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012 Dec 15;380(9859):2197-223.
8. Heidenreich PA, Trogdon JG, Khavjou OA, Butler J, Dracup K, Ezekowitz MD, Finkelstein EA, Hong Y, Johnston SC, Khera A, Lloyd-Jones DM, Nelson SA, Nichol G, Orenstein D, Wilson PW, Woo YJ; American Heart Association Advocacy Coordinating Committee; Stroke Council; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Clinical Cardiology; Council on Epidemiology and Prevention; Council on Arteriosclerosis; Thrombosis and Vascular Biology; Council on Cardiopulmonary; Critical Care; Perioperative and Resuscitation; Council on Cardiovascular Nursing; Council on the Kidney in Cardiovascular Disease; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and Interdisciplinary Council on Quality of Care and Outcomes Research. Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2011 Mar 1;123(8):933-44.
9. Ross JS, Chen J, Lin Z, Bueno H, Curtis JP, Keenan PS, Normand SL, Schreiner G, Spertus JA, Vidán MT, Wang Y, Wang Y, Krumholz HM. Recent national trends in readmission rates after heart failure hospitalization. *Circ Heart Fail*. 2010

10. Leeder S, Raymond S, Greenberg H, Liu H, Esson K. A race against time. The challenge of cardiovascular disease in developing economies. New York: Columbia University, 2004.
11. Cruz Ferreira, R; César das Neves, R; Rodrigues, V. Portugal – Doenças Cérebro-Cardiovasculares em números – 2013. Lisboa Direção-Geral da Saúde, 2013. ISSN 2183-0.
12. Gouveia M, Borges M, Costa J, Oliveira E, David C, C. A. Costs of illness due to hypercholesterolemia in Portugal. *Rev Port Cardiol.* 2004 Jul-Aug;23(7-8):1037-54.
13. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, P. P., Poole-Wilson PA, Stromberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, H. A. & Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart. *Eur J Heart Fail* 2008; 10:933–989.
14. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000 Mar 1;35(3):569-82.
15. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med.* 1997 Apr 17;336(16):1131-41.
16. Olivetti G, Capasso J.M, Sonnenblick EH, Anversa P. Side-to-side slippage of myocytes in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circ Res.* 67 1990:23-34.
17. Kjaer A, Hesse B. Heart failure and neuroendocrine activation: diagnostic, prognostic and therapeutic perspectives. *Clin Physiol.* 2001 Nov;21(6):661-72.
18. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitler J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A; ESC Committee for Practice Guidelines. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J.* 2012 Jul;33(14):1787-847..
19. McMurray JJ. McMurray JJ. CONSENSUS to EMPHASIS: the overwhelming evidence which makes blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system the cornerstone of therapy for systolic heart failure. *Eur J Hear. Fail.* 2011 Sep;13(9):929-36.

20. Chatterjee S, Biondi-Zoccai G, Abbate A, D'Ascenzo F, Castagno D, Mukherjee D. Benefits of  $\beta$  blockers in patients with heart failure and reduced ejection fraction: network meta-analysis. *BMJ*. 2013 Jan 16;346f55.
21. Konstam MA, Kronenberg MW, Rousseau MF, Udelson JE, Melin J, Stewart D, D. & N, Edens TR, Ahn S, Kinan D, et al. Konstam MA, Kronenberg MW, Rousseau MF, Udelson JE, Melin J, Stewart D, Dolan N, Edens TR, Ahn S, Kinan D, et al. Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on the long-term progression of left ventricular dilatation in patients with. *Circulation* 1993 Nov;88(5 Pt 1)2277-83.
22. Greenberg B, Quinones MA, Koilpillai C, Limacher M, Shindler D. Effects of long-term enalapril therapy on cardiac structure and function in patients with left ventricular dysfunction. Results of the SOLVD echocardiography substudy. *Circulation*. 1995 May 15;91(10)2573-81.
23. Doughty RN, Whalley GA, Gamble G, MacMahon S,. Left ventricular remodeling with carvedilol in patients with congestive heart failure due to ischemic heart disease. Australia-New Zealand Heart Failure Research Collaborative Group. *J Am Coll Cardiol*. 1997 Apr;29(5)1060-6.
24. Lowes BD, Gill EA, Abraham WT, Larrain JR, Robertson AD, Bristow MR. Effects of carvedilol on left ventricular mass, chamber geometry, and mitral regurgitation in chronic heart failure. *Am J Cardiol*. 1999 Apr 15;83(8)1201-5.
25. Moss AJ, Zareba W, Hall WJ, Klein H, Wilber DJ, Cannom DS, Daubert JP, Higgins SL, Brown MW, Andrews ML; Multicenter Automatic Defibrillator Implantation Trial II Investigators. Prophylactic implantation of a defibrillator in patients with myocardial infarction and reduced ejection fraction. *N Engl J Med*. 2002 Mar 21;346(12):877-83.
26. Bardy GH, Lee KL, Mark DB, Poole JE, Packer DL, Boineau R, Domanski M, Troutman C, Anderson J, Johnson G, McNulty SE, Clapp-Channing N, Davidson-Ray LD, Fraulo ES, Fishbein DP, Luceri RM, Ip JH; Sudden Cardiac Death in Heart Failure Trial (SCD-HeFT) Investigators. Amiodarone or an implantable cardioverter-defibrillator for congestive heart failure. *N Engl J Med*. 2005 Jan 20;352(3):225-37. Erratum in: *N Engl J Med*. 2005 May 19;352(20):2146.
27. Young JB, Abraham WT, Smith AL, Leon AR, Lieberman R, Wilkoff B, Canby RC, Schroeder JS, Liem LB, Hall S, Wheelan K; Multicenter InSync ICD Randomized Clinical Evaluation (MIRACLE ICD) Trial Investigators. Combined cardiac resynchronization and implantable cardioversion defibrillation in advanced chronic heart failure: the MIRACLE ICD Trial. *JAMA*. 2003 May 28;289(20):2685-94.28.
28. Cleland JG, Daubert JC, Erdmann E, Freemantle N, Gras D, Kappenberger L, Tavazzi L; Cardiac Resynchronization-Heart Failure (CARE-HF) Study Investigators. The effect of cardiac resynchronization on morbidity and mortality in heart failure. *N Engl J Med*. 2005 Apr 14;352(15):1539-49.
29. Moss AJ, Hall WJ, Cannom DS, Klein H, Brown MW, Daubert JP, Estes NA 3rd, Foster E, Greenberg H, Higgins SL, Pfeffer MA, Solomon SD, Wilber D, Zareba W; MADIT-CRT

- Trial Investigators. Cardiac-resynchronization therapy for the prevention of heart-failure events. *N Engl J Med*. 2009 Oct 1;361(14):1329-38.
30. Sutton J, K. M. Reverse remodelling in heart failure with cardiac resynchronisation therapy. *Heart*. Feb 2007; 93(2) 167–171.
31. Abraham W T, Leon A R,. Benefits of cardiac resynchronization therapy sustained for 18 months: results from the MIRACLE program [abstract]. *Circulation*. 2003. 108(Suppl IV)IV629
32. Jhund PS, Macintyre K, Simpson CR, Lewsey JD, Stewart S, Chalmers JW, Capewell S, M. J. Long-term trends in first hospitalization for heart failure and subsequent survival between 1986 and 2003: a population study of 5.1 million people. *Circulation*. 2009;119:515–523.
33. Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, Capewell S, M. J. More “malignant” than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail* 2001;3:315–322.
34. Mann DL, Bristow MR. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation*. 2005 May 31;111(21):2837-49. Review. Erratum in: *Circulation*. 2005 Jul 26;112(4):e75.
35. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, J. R. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs. duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*. 1977 Nov;56(5):786-94.
36. Chiong M, Wang ZV, Pedrozo Z, Cao DJ, Troncoso R, Ibacache M, Nemchenko A, Hill JA, L. S. Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death Dis*. 2011 Dec 22;2:e244. *Cell Death Dis*. 2011 Dec 22;2:e244.
37. Indications for fibrinolytic therapy in suspected acute myocardial infarction: collaborative overview of early mortality and major morbidity results from all randomised trials of more than 1000 patients. Fibrinolytic Therapy Trialists’ (FTT) Collaborative. *Lancet* 1994;343:311–322.
38. Keeley EC, Boura JA, G. C. Primary angioplasty vs. intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet* 2003;361:13–20.
39. Andersen HR, Nielsen TT, Rasmussen K, Thuesen L, Kelbaek H, T. P., Abildgaard U, Pedersen F, Madsen JK, Grande P, Villadsen AB, Haghfelt T, Lomholt P, Husted SE, Vigholt E, Kjaergard HK, M. L. A comparison of coronary angioplasty with fibrinolytic therapy in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003;349:733–742.
40. Boersma E, Maas AC, Deckers JW. Early thrombolytic treatment in acute myocardial infarction: reappraisal of the golden hour. *Lancet* 1996;348: 771–775.
41. Cannon CP, Gibson CM, Lambrew CT, Shoultz DA, Levy D, French WJ, Gore JM, Weaver WD, Rogers WJ, Tiefenbrunn AJ. Relationship of symptom-onset-to-balloon

- time and door-to-balloon time with mortality in patients undergoing angioplasty for acute myocardial infarction. *JAMA*. 2000 Jun 14;283(22):2941-7.
42. Widimsky P, Fajadet J, Danchin N. "Stent 4 Life" targeting PCI at all who will benefit the most. A joint project between EAPCI, Euro-PCR, EUCOMED and the ESC Working Group on Acute Cardiac Care. *EuroIntervention* 2009;4:555, 557.
43. Menon V, Pearte CA, Buller CE, Steg PG, Forman SA, White HD, M. P., Katritsis DG, Caramori P, Lasevitch R, Lobo-Grudzien K, Lamas GA, H. J. Lack of benefit from percutaneous intervention of persistently occluded infarct arteries after the acute phase of myocardial infarction is time independent: insights from Occluded Artery Trial. *Eur Heart J* 2009;30 183–191.
44. Spencer FA, Montalescot G, Fox KA, Goodman SG, Granger CB, Goldberg RJ, Oliveira GB, Anderson FA, Eagle KA, Fitzgerald G, Gore JM; Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE) Investigators. Delay to reperfusion in patients with acute myocardial infarction presenting to acute care hospitals: an international perspective. *Eur Heart J*. 2010 Jun;31(11):1328-36.
45. Luepker RV, Raczynski JM, Osganian S, Goldberg RJ, Finnegan JR Jr, H. J., Goff DC Jr, Eisenberg MS, Zapka JG, Feldman HA, Labarthe DR, McGovern PG, Proschan MA, S.-M. D. Effect of a community intervention on patient delay and emergency medical service use in acute coronary heart disease: The Rapid Early Action for Coronary Treatment (REACT) Trial. *JAMA*. 2000 Jul 5;284(1):60-7.
46. Alter DA, Ko DT, Newman A, T. J. Factors explaining the under-use of reperfusion therapy among ideal patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2006 Jul;27(13):1539-49.
47. Fox KA, Eagle KA, Gore JM, Steg PG & Investigators. The Global Registry of Acute Coronary Events, 1999 to 2009--GRACE. *Heart*. 2010 Jul;96(14):1095-101.
48. Chen J, Hsieh AF, Dharmarajan K, Masoudi FA, K. H. National trends in heart failure hospitalization after acute myocardial infarction for medicare beneficiaries: 1998-2010. *Circulation*. 2013 Dec 17;128(24):2577-84.
49. Steg PG, Dabbous OH, Feldman LJ, Cohen-Solal A, Aumont MC, López-Sendón J, Budaj A, Goldberg RJ, Klein W, Anderson FA Jr; Global Registry of Acute Coronary Events Investigators. Determinants and prognostic impact of heart failure complicating acute coronary syndromes: observations from the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). *Circulation*. 2004 Feb 3;109(4):494-9.
50. Pride YB, Giuseffi JL, Mohanavelu S, Harrigan CJ, Manning WJ, Gibson CM, Appelbaum E. Relation between infarct size in ST-segment elevation myocardial infarction treated successfully by percutaneous coronary intervention and left ventricular ejection fraction three months after the infarct. *Am J Cardiol*. 2010 Sep 1;106(5):635-40.

51. Yoshida K. Quantitative relation of myocardial infarct size and myocardial viability by positron emission tomography to left ventricular ejection fraction and 3-year mortality with and without revascularization. *J Am Coll Cardiol.* 1993 Oct;22(4):984-97.
52. Miller TD, Christian TF, Hopfenspirger MR, Hodge DO, Gersh BJ, G. R. Infarct size after acute myocardial infarction measured by quantitative tomographic 99mTc sestamibi imaging predicts subsequent mortality. *Circulation.* 1995 Aug 1;92(3):334-41.
53. Gajarsa JJ, Kloner RA. Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities. *Heart Fail Rev.* 2011 Jan;16(1):13-21.
54. Anzai T. Post-infarction inflammation and left ventricular remodeling: a double-edged sword. *Circ J.* 2013;77(3):580-7.
55. Yokota H, Heidary S, Katikireddy CK, Nguyen P, Pauly JM, McConnell MV. Quantitative characterization of myocardial infarction by cardiovascular magnetic resonance predicts future cardiovascular events in patients with ischemic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2008 Apr 9;10:17.
56. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation.* 2000 Jun 27;101(25):2981-8.
57. Felker GM, Shaw LK, O. C. A standardized definition of ischemic cardiomyopathy for use in clinical research. *J Am Coll Cardiol.* 2002 Jan 16;39(2):210-8.
58. Khatibzadeh S, Farzadfar F, Oliver J, Ezzati M, M. A. Worldwide risk factors for heart failure: a systematic review and pooled analysis. *Int J Cardiol.* 2013 Sep 30;168(2):1186-94.
59. Bonow RO. The hibernating myocardium: implications for management of congestive heart failure. *Am J Cardiol.* 1995 Jan 19;75(3):17A-25A.
60. Auerbach MA, Schöder H, Hoh C, Gambhir SS, Yaghoubi S, Sayre JW, Phelps ME, Schelbert HR. Prevalence of myocardial viability as detected by positron emission tomography in patients with ischemic cardiomyopathy. *Circulation.* 1999 Jun 8;99(22):2921-6.
61. Shah DJ, Kim HW, James O, Parker M, Wu E, Bonow RO, Judd RM. Prevalence of regional myocardial thinning and relationship with myocardial scarring in patients with coronary artery disease. *JAMA.* 2013 Mar 6;309(9):909-18.
62. Bax JJ, van der Wall EE, H. M. Radionuclide techniques for the assessment of myocardial viability and hibernation. *Heart.* 2004 Aug;90 Suppl 5:v26-33.
63. Allman KC, Shaw LJ, Hachamovitch R, U. J. Myocardial viability testing and impact of revascularization on prognosis in patients with coronary artery disease and left ventricular dysfunction: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2002 Apr 3;39(7):1151-8.



64. Velazquez EJ, Lee KL, Deja MA, Jain A, Sopko G, Marchenko A, Ali IS, P. G., Gradinac S, Abraham WT, Yui M, Prabhakaran D, Szwed H, Ferrazzi P, P. M., O'Connor CM, Panchavinnin P, She L, Bonow RO, Rankin GR, Jones RH, R. J. & STICH Investigators. Coronary-artery bypass surgery in patients with left ventricular dysfunction. *N Engl J Med*. 2011 Apr 28;364(17):1607-16.
65. Oh JK, Velazquez EJ, Menicanti L, Pohost GM, Bonow RO, Lin G, H. A., Ferrazzi P, Wos S, Rao V, Berman D, Bochenek A, Cherniavsky A, Rouleau JL, L. K. S. I. Influence of baseline left ventricular function on the clinical outcome of surgical ventricular reconstruction in patients with ischaemic cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2013 Jan;34(1):39-47.
66. Williams B, Menon M, Satran D, Hayward D, Hodges JS, Burke MN, Poulouse AK, Traverse JH, H. T. Patients with coronary artery disease not amenable to traditional revascularization: prevalence and 3-year mortality. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2010 May 1;75(6):886-91.
67. Schinkel AF, Poldermans D, Rizzello V, Vanoverschelde JL, Elhendy A, Roelandt JR, B. J. Why do patients with ischemic cardiomyopathy and a substantial amount of viable myocardium not always recover in function after revascularization? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004 Feb;127(2):385-90.
68. Heidenreich PA, McDonald KM, Hastie T, Fadel B, Hagan V, Lee BK, H. M. Meta-analysis of trials comparing beta-blockers, calcium antagonists, and nitrates for stable angina. *JAMA*. 1999 May 26;281(20):1927-36.
69. Kolesov VI. Mammary artery-coronary artery anastomosis as method of treatment for angina pectoris. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1967 Oct;54(4):535-44.
70. Gruntzig A. Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis. *Lancet*. 1978 Feb 4;1(8058):263.
71. Mannheimer C, Camici P, Chester MR, Collins A, DeJongste M, Follath F, Hellemans I, Herlitz J, Lüscher T, Pasic M, T. D. The problem of chronic refractory angina; report from the ESC Joint Study Group on the Treatment of Refractory Angina. *Eur Heart J*. 2002 Mar;23(5):355-70.
72. Schoebel FC, Frazier OH, Jessurun GA, De Jongste MJ, Kadipasaoglu KA, Heintzen MP, Cooley DA, Strauer BE, L. M. Refractory angina pectoris in end-stage coronary artery disease: evolving therapeutic concepts. *Am Heart J*. 1997 Oct;134(4):587-602.
73. Henry TD, Satran D, Hodges JS, Johnson RK, Poulouse AK, Campbell AR, Bart BA, Olson RE, Boisjolie CR, Harvey KL, Arndt TL, T. J. Long-term survival in patients with refractory angina. *Eur Hear. J*. 2013 Sep;34(34):2683-8.
74. Kosiborod M, Arnold SV, Spertus JA, McGuire DK, Li Y, Yue P, Jones PG, Olmsted A, Belardinelli L, C. B. Evaluation of ranolazine in patients with type 2 diabetes mellitus and chronic stable angina: results from the TERISA randomized clinical trial (Type 2 Diabetes Evaluation of Ranolazine in Subjects With Chronic Stable Angina). *J Am Coll Cardiol*. 2013 May 21;61(20):2038-45.

75. Fox K, Ford I, Steg PG, Tendera M, Robertson M. BEAUTIFUL Investigators. Relationship between ivabradine treatment and cardiovascular outcomes in patients with stable coronary artery disease and left ventricular systolic dysfunction with limiting angina: a subgroup analysis of the randomized, controlled. *Eur Heart J*. 2009 Oct;30(19):2337-45.
76. Arora RR, Chou TM, Jain D, Fleishman B, Crawford L, McKiernan T. The multicenter study of enhanced external counterpulsation (MUST-EECP): effect of EECP on exercise-induced myocardial ischemia and anginal episodes. *J Am Coll Cardiol*. 1999 Jun;33(7):1833-40.
77. TenVaarwerk IA, Jessurun GA, DeJongste MJ, Andersen C, Mannheimer C, Tadema W, S. M. Clinical outcome of patients treated with spinal cord stimulation for therapeutically refractory angina pectoris. The Working Group on Neurocardiology. *Heart*. 1999 Jul;82(1):82-8.
78. Liao L, Sarria-Santamera A, Matchar DB, Huntington A, Lin S, Whellan DJ, Kong DF. Meta-analysis of survival and relief of angina pectoris after transmyocardial revascularization. *Am J Cardiol*. 2005 May 15;95(10):1243-5.
79. Carmeliet P. Basic concepts of (myocardial) angiogenesis: role of vascular endothelial growth factor and angiopoietin. *Curr Interv Cardiol Reports*. 1999; 1 322–35.
80. Attanasio S, S. G. Therapeutic angiogenesis for the management of refractory angina: current concepts. *Cardiovasc Ther*. 2011 Dec;29(6):e1-e11.
81. Felker GM, Thompson RE, Hare JM, Hruban RH, Clemetson DE, Howard DL, Baughman KL, Kasper EK. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2000 Apr 13;342(15):1077-84.
82. Braunwald E, B. M. Congestive heart failure: fifty years of progress. *Circ*. 2000 Nov 14;102(20 Suppl 4):IV14-23.
83. Manolio TA, Baughman KL, Rodeheffer R, Pearson TA, Bristow JD, Michels VV, Abelmann WH, Harlan WR. Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute workshop. *Am J Cardiol*. 1992 Jun 1;69(17):1458-66.
84. Dec GW, Fuster V. Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1994;331:1564–75.
85. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Anversa P, Leri A. A matter of life and death: cardiac myocyte apoptosis and regeneration. *J Clin Invest*. 2003 May;111(10):1457-9.
86. Fu M. Autoimmunity and idiopathic dilated cardiomyopathy: where we stand? *Autoimmun*. 2008 Sep;41(6):415-8.
87. Souders CA, Bowers SL, Baudino TA. Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res*. 2009 Dec 4;105(12):1164-76.

88. Libby, P, & Braunwald, E. Braunwald's heart disease: A textbook of cardiovascular medicine. Philadelphia: Saunders/Elsevier. Philadelphia: Saunders/Elsevier. 2008.
89. Buckberg, G., Hoffman, J. I. E., Mahajan, A., Saleh, S. & Coghlan, C. Cardiac mechanics revisited: the relationship of cardiac architecture to ventricular function. *Circulation* 118, 2571–87 (2008).
90. HM., S. Macro design, structure, and mechanics of the left ventricle. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000 May;119(5)1053-77.
91. Buckberg G, Hoffman JI, Mahajan A, Saleh S, Coghlan C. Cardiac mechanics revisited: the relationship of cardiac architecture to ventricular function. *Circulation.* 2008 Dec 9;118(24):2571-87.
92. W. B. R. Mill, M. R. Anderson, and R. Hi. Surgical anatomy of the heart," in *Surgery in the Adult*. L. Cohn, Ed., pp. 29–50, McGraw-Hill, New York, NY, USA, 3 edition, 2008. L. Cohn, Ed., pp. 29–50, McGraw-Hill, New York, NY, USA, 3 Ed. 2008
93. Bourdarias, J. Coronary reserve: concept and physiological variations. *Eur Heart J.* 1995 Aug;16 Suppl I2-6.
94. Worton RG, McCulloch EA, Till JE. Physical separation of hemopoietic stem cells differing in their capacity for self-renewal. *J Exp Med.* 1969 Jul 1;130(1)91-103.
95. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell.* 2007 Jun 7;1(1):35-8.
96. Brunt KR, Weisel RD, Li, RK. Stem cells and regenerative medicine — future perspectives. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012 Mar;90(3)327-35.
97. Can A. A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turk J Hematol* 2008; 25 57-9)
98. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell.* 2004;116:639–648.
99. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest.* 2001 Jun;107(11):1395-402.
100. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 28;98(18):10344-9.
101. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, R. M., Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature.* 2004 Apr 8;428(6983)664-8.

102. Dinsmore JH, Dib N. Stem cells and cardiac repair: a critical analysis. *J Cardiovasc Transl Res.* 2008 Mar;1(1)41-54.
103. Ellison GM, Torella D, Karakikes I, Nadal-Ginard B. Myocyte death and renewal: modern concepts of cardiac cellular homeostasis. *Nat Clin Pr. Cardiovasc Med.* 2007 Feb;4 Suppl 1S52-9.
104. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, K. & H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003 Sep 19;114(6)763-76.
105. Ellison GM, Nadal-Ginard B, Torella D. Optimizing cardiac repair and regeneration through activation of the endogenous cardiac stem cell compartment. *J Cardiovasc Transl Res.* 2012 Oct;5(5)667-77.
106. Zhuo Y, Li SH, Chen MS, et al. Aging impairs the angiogenic response to ischemic injury and the activity of implanted cells: combined consequences for cell therapy in older recipients. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010;139(5)1286-1294, 1294, e1-e2.
107. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981 Jul 9;292(5819)154-6.
108. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.
109. Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J. Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ Res.* 1994 Aug;75(2):233-44.
110. Min JY, Yang Y, Converso KL, Liu L, Huang Q, Morgan JP, Xiao YF. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol* (1985). 2002 Jan;92(1):288-96.
111. van Laake LW, Passier R, Monshouwer-Kloots J, Verkleij AJ, Lips DJ, Freund C, den Ouden K, Ward-van Oostwaard D, Korving J, Tertoolen LG, van Echteld CJ, Doevendans PA, Mummery CL. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction. *Stem Cell Res.* 2007 Oct;1(1):9-24.
112. Shiba Y, Fernandes S, Zhu WZ, Filice D, Muskheli V, Kim J, Palpant NJ, Gantz J, Moyes KW, Reinecke H, Van Biber B, Dardas T, Mignone JL, Izawa A, Hanna R, Viswanathan M, Gold JD, Kotlikoff MI, Sarvazyan N, Kay MW, Murry CE, Laflamme MA. Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature.* 2012 Sep 13;489(7415):322-5.
113. Wilmut I. Consternation and confusion following EU patent judgment. *Cell Stem Cell.* 2011 Dec 2;9(6)498-9.

114. Swijnenburg RJ, Tanaka M, Vogel H, Baker J, Kofidis T, Gunawan F, Lebl DR, Caffarelli AD, de Bruin JL, Fedoseyeva EV, Robbins RC. Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium. *Circulation*. 2005 Aug 30;112(9 Suppl):I166-72.
115. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76.
116. Okita K, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. *Philos Trans R Soc L. B Biol Sci*. 2011 Aug 12;366(1575):2198-207.
117. Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, Perez-Terzic C, Ikeda Y, T. A. Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 2009 Aug 4;120(5):408-16.
118. Gu M, Nguyen PK, Lee AS, Xu D, Hu S, Plews JR, Han L, Huber BC, Lee WH, Gong Y, de Almeida PE, Lyons J, Ikeno F, Pacharinsak C, Connolly AJ, Gambhir SS, Robbins RC, Longaker MT, Wu JC. Microfluidic single-cell analysis shows that porcine induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells improve myocardial function by paracrine activation. *Circ Res*. 2012 Sep 14;111(7):882-93.
119. Templin C, Zweigerdt R, Schwanke K, Olmer R, Ghadri JR, Emmert MY, Müller E, Küest SM, Cohrs S, Schibli R, Kronen P, Hilbe M, Reinisch A, Strunk D, Haverich A, Hoerstrup S, Lüscher TF, Kaufmann PA, Landmesser U, Martin U. Transplantation and tracking of human-induced pluripotent stem cells in a pig model of myocardial infarction: assessment of cell survival, engraftment, and distribution by hybrid single photon emission computed tomography/computed tomography of sodium iodide symporter transgene expression. *Circulation*. 2012 Jul 24;126(4):430-9.
120. Li X, Zhang F, Song G, Gu W, Chen M, Yang B, Li D, Wang D, Cao K. Intramyocardial Injection of Pig Pluripotent Stem Cells Improves Left Ventricular Function and Perfusion: A Study in a Porcine Model of Acute Myocardial Infarction. *PLoS One*. 2013 Jun 21;8(6):e66688.
121. Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, Ambartsumyan G, Aimiwu O, Richter L, Zhang J, Khvorostov I, Ott V, Grunstein M, et al. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell*. 2009;5:111–123.
122. Rhee YH, Ko JY, Chang MY, Yi SH, Kim D, Kim CH, Shim JW, Jo AY, Kim BW, Lee H, Lee SH, Suh W, Park CH, Koh HC, Lee YS, Lanza R, Kim KS, Lee SH. Protein-based human iPS cells efficiently generate functional dopamine neurons and can treat a rat model of Parkinson disease. *J Clin Invest*. 2011 Jun;121(6):2326-35.
123. Puri MC, Nagy A. Concise review: Embryonic stem cells versus induced pluripotent stem cells: the game is on. *Stem Cells*. 2012 Jan;30(1):10-4.
124. De Lázaro I, Yilmazer A, Kostarelos K. Induced pluripotent stem (iPS) cells: A new source for cell-based therapeutics? *J Control Release*. 2014 Jul 10;185C37-44. doi 10.1016/j.jconrel.2014.04.011. Epub 2014 Apr 16.

125. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961 Feb;9:493-5.
126. Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, M. J. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell.* 2005 Jul 29;122(2):289-301.
127. Menasché P. Skeletal myoblasts and cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol.* 2008 Oct;45(4):545-53.
128. Dowell JD, Rubart M, Pasumarthi KB, Soonpaa MH, Field LJ. Myocyte and myogenic stem cell transplantation in the heart. *Cardiovasc Res.* 2003 May 1;58(2):336-50.
129. Muller-Ehmsen J., Peterson K.L., Kedes L., Whittaker P., Dow J.S., Long T.I., et al. Rebuilding a damaged heart: long-term survival of transplanted neonatal rat cardiomyocytes after myocardial infarction and effect on cardiac function. *Circulation.* 2002, 105:1720–1726.
130. Reinecke H, Poppa V, Murry CE. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J Mol Cell Cardiol.* 2002 Feb;34(2):241-9.
131. Maurel A, Azarnoush K, Sabbah L, Vignier N, Le Lorc'h M, Mandet C, B. A., Garcin I, Carrion C, Fiszman M, Bruneval P, Hagege A, Carpentier A, Menasché P. Can cold or heat shock improve skeletal myoblast engraftment in infarcted myocardium? *Transplantation.* 2005 Sep 15;80(5):660-5.
132. Ciecierska A, Chodkowska K, Motyl T, Sadkowski T. Myogenic cells applications in regeneration of post-infarction cardiac tissue. *J Physiol Pharmacol.* 2013 Aug;64(4):401-8.
133. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2006 Apr 27;354(17):1813-26.
134. Thomas ED. Bone marrow transplantation from the personal viewpoint. *Int J Hematol.* 2005 Feb;81(2):89-93.
135. Rector K, Liu Y, Van Zant G. Comprehensive hematopoietic stem cell isolation methods. *Methods Mol Biol.* 2013;97:61-15.
136. Takizawa H, Schanz U, Manz MG. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells: mission accomplished? *Swiss Med Wkly.* 2011 Dec 29;141:w13316.
137. Dimmeler S, Zeiher AM. Cell therapy of acute myocardial infarction: open questions. *Cardiology.* 2009;113(3):155-60.
138. Cuende N, Rico L, Herrera C. Concise review: bone marrow mononuclear cells for the treatment of ischemic syndromes: medicinal product or cell transplantation? *Stem Cells Transl Med.* 2012 May;1(5):403-8.

139. Kucia M, Dawn B, Hunt G, Guo Y, Wysoczynski M, Majka M, Ratajczak J, Rezzoug F, Ildstad ST, Bolli R, Ratajczak MZ. Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction. *Circ Res*. 2004 Dec 10;95(12):1191-9.
140. Sheikh AY, Lin SA, Cao F, Cao Y, van der Bogt KE, Chu P, Chang CP, Contag CH, Robbins RC, Wu JC. Molecular imaging of bone marrow mononuclear cell homing and engraftment in ischemic myocardium. *Stem Cells*. 2007 Oct;25(10):2677-84.
141. Kobayashi T, Hamano K, Li TS, Katoh T, Kobayashi S, Matsuzaki M, Esato K. Enhancement of angiogenesis by the implantation of self bone marrow cells in a rat ischemic heart model. *J Surg Res*. 2000 Apr;89(2):189-95.
142. Zhang S, Wang D, Estrov Z, Raj S, Willerson JT, Yeh ET. Both cell fusion and transdifferentiation account for the transformation of human peripheral blood CD34-positive cells into cardiomyocytes in vivo. *Circulation*. 2004 Dec 21;110(25):3803-7.
143. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. 2004 Apr 8;428(6983):668-73.
144. Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Säwén P, Röhl W, Hescheler J, Taneera J, Fleischmann BK, Jacobsen SE. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med*. 2004 May;10(5):494-501.
145. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, M. H., Mori Y, Iba O, Tateishi E, Kosaki A, Shintani S, Murohara T, Imaizumi T, Iwasaka T. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*. 2001 Aug 28;104(9):1046-52.
146. Li CJ, Gao RL, Yang YJ, Hu FH, Yang WX, You SJ, Song LF, Ruan YM, Qiao SB, Chen JL, Li JJ. Implantation of autologous bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances coronary capillaries and systolic function in miniswine. *Chin Med Sci J*. 2008 Dec;23(4):234-8.
147. Leu S, Sun CK, Sheu JJ, Chang LT, Yuen CM, Yen CH, Chiang CH, Ko SF, Pei SN, Chua S, Youssef AA, Wu CJ, Yip HK. Autologous bone marrow cell implantation attenuates left ventricular remodeling and improves heart function in porcine myocardial infarction: an echocardiographic, six-month angiographic, and molecular-cellular study. *Int J Cardiol*. 2011 Jul 15;150(2):156-68.
148. Doyle B, Kemp BJ, Chareonthaitawee P, Reed C, Schmeckpeper J, Sorajja P, Russell S, Araoz P, Riederer SJ, Caplice NM. Dynamic tracking during intracoronary injection of 18F-FDG-labeled progenitor cell therapy for acute myocardial infarction. *J Nucl Med*. 2007 Oct;48(10):1708-14.

149. Forrester JS, White AJ, Matsushita S, Chakravarty T, Makkar RR. New paradigms of myocardial regeneration post-infarction: tissue preservation, cell environment, and pluripotent cell sources. *JACC Cardiovasc Interv.* 2009 Jan;2(1)1-8.
150. Burdon TJ, Paul A, Noiseux N, Prakash S, Shum-Tim D. Bone marrow stem cell derived paracrine factors for regenerative medicine: current perspectives and therapeutic potential. *Bone Marrow Res.* 2011;2011207326.
151. Gallina C, Turinetto V, G. C. Gallina C, Turinetto V, Giachino C. A New Paradigm in Cardiac Regeneration: The Mesenchymal Stem Cell Secretome. *Stem Cells Int.* 2015;2015765846.
152. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976 Sep;4(5)267-74.
153. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
154. Hoogduijn MJ, Crop MJ, Peeters AM, Van Osch GJ, Balk AH, Ijzermans JN, Weimar W, Baan CC. Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells Dev.* 2007 Aug;16(4)597-604.
155. Minteer D, Marra KG, Rubin J. Adipose-derived mesenchymal stem cells: biology and potential applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2013;12959-71.
156. Farini A, Sitzia C, Erratico S, Meregalli M, Torrente Y. Clinical applications of mesenchymal stem cells in chronic diseases. *Stem Cells Int.* 2014;2014306573.
157. Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif Organs.* 2001 Mar;25(3)187-93.
158. Thiele J, Varus E, Wickenhauser C, Kvasnicka HM, Lorenzen J, Gramley F, Metz KA, Rivero F, Beelen DW. Mixed chimerism of cardiomyocytes and vessels after allogeneic bone marrow and stem-cell transplantation in comparison with cardiac allografts. 27;77(12)1902-5., *Transplantation.* 2004 Jun
159. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.* 2003 Oct;31(10)890-6.
160. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Stem Cells.* 2008 Jan;26(1)212-22.
161. Huang XP, Sun Z, Miyagi Y, McDonald Kinkaid H, Zhang L, Weisel RD, Li RK. Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and



- limits their long-term benefits for myocardial repair. *Circulation*. 2010 Dec 7;122(23)2419-29.
162. Dhingra S, Huang XP, Li RK. Challenges in allogeneic mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair. *Trends Cardiovasc Med*. 2010 Nov;20(8)263-8.
163. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, D. D., Fitton T, Kuang JQ, Stewart G, Lehrke S, Baumgartner WW, Martin BJ, Heldman AW Hare JM. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 9;102(32)11474-9.
164. Caplan, A. & Dennis, J. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006 Aug 1;98(5)1076-84.
165. Wang CH, Cherng WJ, Yang NI, Kuo LT, Hsu CM, Yeh HI, Lan YJ, Yeh CH, Stanford WL. Late-outgrowth endothelial cells attenuate intimal hyperplasia contributed by mesenchymal stem cells after vascular injury. *Arter. Thromb Vasc Biol*. 2008 Jan;28(1)54-60.
166. Sohni A, Verfaillie C. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells Int*. 2013;2013130763.
167. Tang J, Wang J, Yang J, Kong X, Zheng F, Guo L, Zhang L, Huang Y. Mesenchymal stem cells over-expressing SDF-1 promote angiogenesis and improve heart function in experimental myocardial infarction in rats. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2009 Oct;36(4)644-50.
168. Ghadge SK, Mühlstedt S, Ozcelik C, Bader M. SDF-1 $\alpha$  as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction. *Pharmacol Ther*. 2011 Jan;129(1)97-108.
169. Davani S, Marandin A, Mersin N, Royer B, Kantelip B, Hervé P, Etievent JP, Kantelip JP. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation*. 2003 Sep 9;108 Suppl 1II253-8.
170. Tang YL, Zhao Q, Zhang YC, Cheng L, Liu M, Shi J, Yang YZ, Pan C, Ge J, Phillips MI. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regul Pept*. 2004 Jan 15;117(1)3-10.
171. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002 Jan 1;105(1)93-8.
172. Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, Yamagishi M, Mori H, Kangawa K, Kitamura S. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Dec;287(6)H2670-6.

173. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg.* 2002 Jun;73(6):1919-25.
174. Makkar RR, Price MJ, Lill M, Frantzen M, Takizawa K, Kleisli T, Zheng J, Kar S, McClellan R, Miyamota T, Bick-Forrester J, Fishbein MC, Shah PK, Forrester JS, Sharifi B, Chen PS, Qayyum M. Intramyocardial injection of allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells without immunosuppression preserves cardiac function in a porcine model of myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2005 Dec;10(4):225-33.
175. Yoon YS, Park JS, Tkebuchava T, Luedeman C, Losordo DW. Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. *Circulation.* 2004 Jun 29;109(25):3154-7.
176. Breitbach M, Bostani T, Roell W, Xia Y, Dewald O, Nygren JM, Fries JW, Tiemann K, Bohlen H, Hescheler J, Welz A, Bloch W, Jacobsen SE, Fleishmann BK. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood.* 2007 Aug 15;110(4):1362-9.
177. Goessling W, North TE. Repairing quite swimmingly: advances in regenerative medicine using zebrafish. *Dis Model Mech.* 2014 Jul;7(7):769-76.
178. Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 21;95(15):8801-5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 21;95(15):8801-5.
179. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2001 Jun 7;344(23):1750-7.
180. Hsieh PC, Segers VF, Davis ME, MacGillivray C, Gannon J, Molkenstin JD, Robbins J, Lee RT. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med.* 2007 Aug;13(8):970-4. Epub 2007 Jul 29.
181. Nadal-Ginard B, Ellison GM, Torella D. The cardiac stem cell compartment is indispensable for myocardial cell homeostasis, repair and regeneration in the adult. *Stem Cell Res.* 2014 Nov;13(3 Pt B):615-30.
182. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Guinard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med.* 2002 Jan 3;346(1):5-15.
183. Bayes-Genis A, Roura S, Prat-Vidal C, Farré J, Soler-Botija C, de Luna AB, Cinca J. Chimerism and microchimerism of the human heart: evidence for cardiac regeneration. *Nat Clin Pr Cardiovasc Med.* 2007 Feb;4 Suppl 1:S40-5.

184. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisén J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*. 2009 Apr 3;324(5923):98-102.
185. Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, Yang VK, Cai L, Wang M, Wu TD, Guerquin-Kern JL, Lechene CP, Lee RT. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*. 2013 Jan 17;493(7432):433-6.
186. Koudstaal S, Jansen Of Lorkeers SJ, Gaetani R, Gho JM, van Slochteren FJ, Sluijter JP, Doevendans PA, Ellison GM, Chamuleau SA. Concise review: heart regeneration and the role of cardiac stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 2013 Jun;2(6):434-43.
187. Chamuleau SA, Vrijssen KR, Rokosh DG, Tang XL, Piek JJ, Bolli R. Cell therapy for ischaemic heart disease: focus on the role of resident cardiac stem cells. *Neth Hear. J*. 2009 May;17(5):199-207.
188. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Scheneider MD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 14;100(21):12313-8.
189. Oyama T, Nagai T, Wada H, Naito AT, Matsuura K, Iwanaga K, Takahashi T, Goto M, Mikami Y, Yasuda N, Akazawa H, Uezumi A, Takeda S, Komuro I. Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo. *J Cell Biol*. 2007 Jan 29;176(3):329-41.
190. Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, D. A. A., Yasuzawa-Amano S, Trofimova I, Siggins RW, Lecapitaine N, Cascapera S, B., AP, D'Alessandro DA, Zias E, Quaini F, Urbanek K, Michler RE, Bolli R, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Aug 28;104(35):14068-73.
191. Dawn B, Stein AB, Urbanek K, Rota M, Whang B, Rastaldo R, Torella D, Tang XL, Rezazadeh A, Kajstura J, Leri A, Hunt G, Varma J, Prabhu SD, Anversa P, Bolli R. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 8;102(10):3766-71.
192. Wang X, Hu Q, Nakamura Y, Lee J, Zhang G, From AH, Zhang J. The role of the sca-1+/CD31- cardiac progenitor cell population in postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells*. 2006 Jul;24(7):1779-88.
193. Johnston PV, Sasano T, Mills K, Evers R, Lee ST, Smith RR, Lardo AC, L. S. & Steenbergen C, Gerstenblith G, Lange R, Marban E. Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2009 Sep 22;120(12):1075-83
194. Lee ST, White AJ, Matsushita S, Malliaras K, Steenbergen C, Zhang Y, Li TS, Terrovitis J, Yee K, Simsir S, Makkar R, Marban E. Intramyocardial injection of autologous cardiospheres or cardiosphere-derived cells preserves function and minimizes

- adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure post-myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Jan 25;57(4)455-65.
195. Bolli R, Tang XL, Sanganalmath SK, Rimoldi O, Mosna F, Abdel-Latif A, Jneid H, Rota M, Leri A, Kajstura J. Intracoronary delivery of autologous cardiac stem cells improves cardiac function in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2013 Jul 9;128(2)122-31.
196. Fuentes T, Kearns-Jonker M. Endogenous cardiac stem cells for the treatment of heart failure. *Stem Cells Cloning*. 2013 Mar 25;61-12.
197. Yoder MC. Human Endothelial Progenitor Cells. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 July; 2(7): a006692. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 July; 2(7) a006692.
198. Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res*. 2012 Feb 17;110(4)624-37.
199. Joggerst SJ, Hatsopoulos A. Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers. *Expert Rev Mol Med*. 2009 Jul 8;11e20.
200. Wessels A, Pérez-Pomares J. The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004 Jan;276(1)43-57.
201. Smart N, Riley PR. The epicardium as a candidate for heart regeneration. *Futur. Cardiol*. 2012 Jan;8(1)53-69.
202. Gajzer DC, Balbin J, Chaudhry HW. Thymosin  $\beta$ 4 and cardiac regeneration: are we missing a beat? *Stem Cell Rev*. 2013 Jun;9(3)303-12.
203. Laughlin MJ. Umbilical cord blood for allogeneic transplantation in children and adults. *Bone Marrow Transplant*. 2001 Jan;27(1)1-6.
204. Acosta SA, Franzese N, Staples M, Weinbren NL, Babilonia M, Patel J, M., N, Simancas AJ, Slakter A, Caputo M, Patel M, Franyuti G, Franzblau MH, S. L., Gonzales-Portillo C, Diamandis T, Shinozuka K, Tajiri N, Sanberg PR, Kaneko Y, Miller LW, Borlongan CV. Human Umbilical Cord Blood for Transplantation Therapy in Myocardial Infarction. *J Stem Cell Res Ther*. 2013 Jul 1;(Suppl 4).
205. Ma N, Ladilov Y, Moebius JM, Ong L, Piechaczek C, Dávid A, Kaminski A, Choi YH, Li W, Egger D, Stamm C, Steinhoff G. Intramyocardial delivery of human CD133+ cells in a SCID mouse cryoinjury model: Bone marrow vs. cord blood-derived cells. *Cardiovasc Res*. 2006 Jul 1;71(1)158-69.
206. Kim DW, Staples M, Shinozuka K, Pantcheva P, Kang SD, Borlongan CV. Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications. *Int J Mol Sci*. 2013 May 31;14(6)11692-712.
207. López Y, Lutjemeier B, Seshareddy K, Trevino EM, Hageman KS, Musch TI, Borgarelli M, Weiss ML. Wharton's jelly or bone marrow mesenchymal stromal cells improve

- cardiac function following myocardial infarction for more than 32 weeks in a rat model: a preliminary report. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2013 Jan;8(1)46-59.
208. Zhang W, Liu XC, Yang L, Zhu DL, Zhang YD, Chen Y, Zhang HY. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells promote myocardial regeneration and cardiac repair after miniswine acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis*. 2013 Nov;24(7)549-58.
  209. Evangelista M, Soncini M, Parolini O. Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? *Cytotechnology*. 2008 Sep;58(1)33-42.
  210. Zhao P, Ise H, Hongo M, Ota M, Konishi I, Nikaido T. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation*. 2005 Mar 15;79(5)528-35.
  211. Petsche Connell J, Camci-Unal G, Khademhosseini A, Jacot JG. Amniotic fluid-derived stem cells for cardiovascular tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev*. 2013 Aug;19(4)368-79.
  212. Makhoul G, Chiu RC, Cecere R. Placental mesenchymal stem cells: a unique source for cellular cardiomyoplasty. *Ann Thorac Surg*. 2013 May;95(5)1827-33.
  213. Kabir R, Gupta M, Aggarwal A, Sharma D, Sarin A, Kola M. Imperative role of dental pulp stem cells in regenerative therapies: a systematic review. *Niger J Surg*. 2014 Jan;20(1)1-8.
  214. Gandia C, Armiñan A, García-Verdugo JM, Lledó E, Ruiz A, M. M., Sanchez-Torrijos J, Payá R, Mirabet V, Carbonell-Uberos F, Llop M, Montero JA, Sepúlveda P. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells*. 2008 Mar;26(3)638-45.
  215. Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J, Wakita H, Nakamura H, Into T, Matsushita K, Nakashima M. A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. *Stem Cells*. 2008 Sep;26(9)2408-18.
  216. Dib N, Menasche P, Bartunek JJ, Zeiher AM, Terzic A, Chronos NA, H. T., Peters NS, Fernández-Avilés F, Yacoub M, Sanborn TA, Demaria A, Schatz RA, T., DA, Fuchs S, Itescu S, Miller LW, Dinsmore JH, Dangas GD, Popma JJ, Hall JL, Holmes DR Jr. International Society for Cardiovascular Translational Research. Recommendations for successful training on methods of delivery of biologics for cardiac regeneration: a report of the International Society for Cardiovascular Translational Research. *JACC Cardiovasc Interv*. 2010 Mar;3(3)265-75.
  217. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction. *Dtsch Med Wochenschr*. 2001 Aug 24;126(34-35)932-8.

218. Keith MC, Tokita Y, Tang XL, Ghafghazi S, Moore JB 4th, Hong KU, E. J., Amraotkar AR, Guo H, Ganzel BL, Grubb KJ, Flaherty MP, Vajravelu BN, Wysoczynski M, Bolli R. Effect of the stop-flow technique on cardiac retention of c-kit positive human cardiac stem cells after intracoronary infusion in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol*. 2015 Sep;110(5):503.
219. Wu K, Mo X, Lu S, Han Z. Retrograde delivery of stem cells: promising delivery strategy for myocardial regenerative therapy. *Clin Transplant*. 2011 Nov-Dec;25(6):830-3.
220. Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Knapp WH, Drexler H. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation*. 2005 May 3;111(17):2198-202.
221. Freyman T, Polin G, Osman H, Crary J, Lu M, Cheng L, Palasis M, Wilensky RL. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2006 May;27(9):1114-22.
222. Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet*. 2004 Mar 6;363(9411):783-4.
223. Perin EC, Silva GV, Assad JA, Vela D, Buja LM, Sousa AL, Litovsky S, Lin J, Vaughn WK, Coulter S, Fernandes MR, Willerson JT. Comparison of intracoronary and transendocardial delivery of allogeneic mesenchymal cells in a canine model of acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2008 Mar;44(3):486-95.
224. Grieve SM, Bhindi R, Seow J, Doyle A, Turner AJ, Tomka J, Lay W, Gill A, Hunyor SN, Figtree GA. Microvascular obstruction by intracoronary delivery of mesenchymal stem cells and quantification of resulting myocardial infarction by cardiac magnetic resonance. *Circ Heart Fail*. 2010 May;3(3):e5-6.
225. Toma C, Wagner WR, Bowry S, Schwartz A, Villanueva F. Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observations of cell kinetics. *Circ Res*. 2009 Feb 13;104(3):398-402.
226. Nadal-Ginard B, Fuster V. Myocardial cell therapy at the crossroads. *Nat Clin Pr. Cardiovasc Med*. 2007 Jan;4(1):1.
227. Sieveking DP, Ng MK. Cell therapies for therapeutic angiogenesis: back to the bench. *Vasc Med*. 2009 May;14(2):153-66.
228. Boudoulas KD, Hatzopoulos AK. Cardiac repair and regeneration: the Rubik's cube of cell therapy for heart disease. *Dis Model Mech*. 2009 Jul-Aug;2(7-8):344-58.
229. Anand IS, Florea VG, Fisher L. Surrogate end points in heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2002 May 1;39(9):1414-21.

230. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, Kögler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 2002 Oct 8;106(15):1913-8.
231. Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, Grünwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002 Dec 10;106(24):3009-17.
232. Leistner DM, Fischer-Rasokat U, Honold J, Seeger FH, Schächinger V, Lehmann R, Martin H, Burck I, Urbich C, Dimmeler S, Zeiher AM, Assmus B. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy. *Clin Res Cardiol*. 2011 Oct;100(10):925-34.
233. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, B. C., Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganzer A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 2004 Jul 10-16;364(9429):141-8.
234. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Pirr J, Rager U, Lippolt P, Hahn A, Fichtner S, Schaefer A, Arseniev L, Ganzer A, Drexler H. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: 5-year follow-up from the randomized-controlled BOOST trial. *Eur Heart J*. 2009 Dec;30(24):2978-84.
235. Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM; REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006 Sep 21;355(12):1210-21.
236. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, K. M., Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, D. S., Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2006 Jan 14;367(9505):113-21.
237. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, E. K., Ilebakk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Grogard H, Bjørnerheim R, Brekke M, Müller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006 Sep 21;355(12):1199-209.
238. Ge J, Li Y, Qian J, Shi J, Wang Q, Niu Y, Fan B, Liu X, Zhang S, Sun A, Zou Y. Efficacy of emergent transcatheter transplantation of stem cells for treatment of acute myocardial infarction (TCT-STAMI). *Heart*. 2006 Dec;92(12):1764-7.
239. Meluzín J, Mayer J, Groch L, Janousek S, Hornáček I, Hlinomaz O, K. P., Panovský R, Prásek J, Kamínek M, Staníček J, Klabusay M, Korístek Z, Navrátil M, Dusek L, Vinklárková J. Autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in

- patients with acute myocardial infarction: the effect of the dose of transplanted cells on myocardial function. *Am Heart J.* 2006 Nov;152(5):975.e9-15.
240. Cao F, Sun D, Li C, Narsinh K, Zhao L, Li X, Feng X, Zhang J, Duan Y, Wang J, Liu D, Wang H. Long-term myocardial functional improvement after autologous bone marrow mononuclear cells transplantation in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: 4 years follow-up. *Eur Heart J.* 2009 Aug;30(16):1986-94.
241. Yousef M, Schannwell CM, Köstering M, Zeus T, Brehm M, Strauer BE. The BALANCE Study: clinical benefit and long-term outcome after intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Jun 16;53(24):2262-9.
242. Assmus B, Leistner DM, Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Sedding D, Yu J, Corti R, Mathey DG, Barth C, Mayer-Wehrstein C, Burck I, Sueselbeck T, Dill T, Hamm CW, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM; REPAIR-AMI Study Group. Long-term clinical outcome after intracoronary application of bone marrow-derived mononuclear cells for acute myocardial infarction: migratory capacity of administered cells determines event-free survival. *Eur Heart J.* 2014 May 14;35(19):1275-83.
243. Beitnes JO, Hopp E, Lunde K, Solheim S, Arnesen H, Brinchmann JE, Forfang K, Aakhus S. Long-term results after intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction: the ASTAMI randomised, controlled study. *Heart.* 2009 Dec;95(24):1983-9.
244. Seeger FH, Tonn T, Krzossok N, Zeiher AM, Dimmeler S. Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2007 Mar;28(6):766-72.
245. Egeland T, Brinchmann JE. The REPAIR-AMI and ASTAMI trials: cell isolation procedures. *Eur Heart J.* 2007 Sep;28(17):2174-5.
246. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation.* 2006 Mar 14;113(10):1287-94.
247. Huikuri HV, Kervinen K, Niemelä M, Ylitalo K, Säily M, Koistinen P, Savolainen ER, Ukkonen H, Pietilä M, Airaksinen JK, Knuuti J, Mälikallio TH; FINCELL Investigators. Effects of intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells on left ventricular function, arrhythmia risk profile, and restenosis after thrombolytic therapy of acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2008 Nov;29(22):2723-32.
248. Tendera M, Wojakowski W, Rużyłło W, Chojnowska L, Kepka C, Tracz W, Musiałek P, Piwowarska W, Nessler J, Buszman P, Grajek S, Breborowicz P, Majka M, Ratajczak MZ; REGENT Investigators. Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI



- and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial. *Eur Heart J.* 2009 Jun;30(11):1313-21.
249. Hirsch A, Nijveldt R, van der Vleuten PA, Tijssen JG, van der Giessen WJ, Tio RA, Waltenberger J, ten Berg JM, Doevendans PA, Aengevaeren WR, Zwaginga JJ, Biemond BJ, van Rossum AC, Piek JJ, Zijlstra F; HEBE Investigators. Intracoronary infusion of mononuclear cells from bone marrow or peripheral blood compared with standard therapy in patients after acute myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention: results of the randomized controlled HEBE trial. *Eur Heart J.* 2011 Jul;32(14):1736-47.
  250. Van der Laan AM, Hirsch A, Haeck JD, Nijveldt R, Delewi R, Biemond BJ, Tijssen JG, Marques KM, Zijlstra F, van Rossum AC, Piek JJ. Recovery of microcirculation after intracoronary infusion of bone marrow mononuclear cells or peripheral blood mononuclear cells in patients treated by primary percutaneous coronary intervention the Doppler substudy of the Hebe trial. *JACC Cardiovasc Interv.* 2011 Aug;4(8):913-20.
  251. Gyöngyösi M, Lang I, Dettke M, Beran G, Graf S, Sochor H, Nyolczas N, Charwat S, Hemetsberger R, Christ G, Edes I, Balogh L, Krause KT, Jaquet K, Kuck KH, Benedek I, Hintea T, Kiss R, Préda I, Kotevski V, Pejkov H, Zamini S, Khorsand A, Sodeck G, Kaider A, Maurer G, Glogar D. Combined delivery approach of bone marrow mononuclear stem cells early and late after myocardial infarction: the MYSTAR prospective, randomized study. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2009 Jan;6(1):70-81.
  252. Traverse JH, Henry TD, Ellis SG, Pepine CJ, Willerson JT, Zhao DX, Forder JR, Byrne BJ, Hatzopoulos AK, Penn MS, Perin EC, Baran KW, Chambers J, Lambert C, Raveendran G, Simon DI, Vaughan DE, Simpson LM, Gee AP, Taylor DA, Cogle CR, Thomas JD, Silva GV, Jorgenson BC, Olson RE, Bowman S, Francescon J, Geither C, Handberg E, Smith DX, Baraniuk S, Piller LB, Loghin C, Aguilar D, Richman S, Zierold C, Bettencourt J, Sayre SL, Vojvodic RW, Skarlatos SI, Gordon DJ, Ebert RF, Kwak M, Moyé LA, Simari RD; Cardiovascular Cell Therapy ResearchNetwork. Effect of intracoronary delivery of autologous bone marrow mononuclear cells 2 to 3 weeks following acute myocardial infarction on left ventricular function: the LateTIME randomized trial. *JAMA.* 2011 Nov 16;306(19):2110-9.
  253. Sürder D, Manka R, Lo Cicero V, Moccetti T, Rufibach K, Soncin S, T. L., Radrizzani M, Astori G, Schwitter J, Erne P, Zuber M, Auf der Maur C, J. P., Gaemperli O, Windecker S, Moschovitis A, Wahl A, Bühler I, Wyss C, Kozerke S, Landmesser U, Lüscher TF, Corti R. Intracoronary injection of bone marrow-derived mononuclear cells early or late after acute myocardial infarction: effects on global left ventricular function. *Circulation.* 2013 May 14;127(19):1968-79.
  254. Traverse JH, Henry TD, Pepine CJ, Willerson JT, Zhao DX, Ellis SG, Forder JR, Anderson RD, Hatzopoulos AK, Penn MS, Perin EC, Chambers J, Baran KW, Raveendran G, Lambert C, Lerman A, Simon DI, Vaughan DE, Lai D, Gee AP, Taylor DA, Cogle CR, Thomas JD, Olson RE, Bowman S, Francescon J, Geither C, Handberg E, Kappenman C, Westbrook L, Piller LB, Simpson LM, Baraniuk S, Loghin C, Aguilar D, Richman S, Zierold C, Spoon DB, Bettencourt J, Sayre SL, Vojvodic RW, Skarlatos SI, Gordon DJ,

- Ebert RF, Kwak M, Moyé LA, Simari RD; Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTRN). Effect of the use and timing of bone marrow mononuclear cell delivery on left ventricular function after acute myocardial infarction: the TIME randomized trial. *JAMA*. 2012 Dec 12;308(22):2380-9. Erratum in: *JAMA*. 2013 Jan 23;309(4):343. *JAMA*. 2015 Jul 7;314(1):86.
255. Ye Z, Zhang BL, Zhao XX, Qin YW, Wu H, Cao J, Zhang JL, Hu JQ, Zheng X, XU RL. Intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells contributes to longstanding improvements of left ventricular performance and remodelling after acute myocardial infarction: a meta-analysis. *Heart Lung Circ*. 2012 Nov;21(11):725-33.
  256. Clifford DM, Fisher SA, Brunskill SJ, Doree C, Mathur A, Watt S, Martin-Redon E. Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Feb 15;2CD006536.
  257. Jeevanantham V, Butler M, Saad A, Abdel-Latif A, Zuba-Surma EK, Dawn B. Adult bone marrow cell therapy improves survival and induces long-term improvement in cardiac parameters: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2012 Jul 31;126(5):551-68.
  258. de Jong R, Houtgraaf JH, Samiei S, Boersma E, Duckers HJ. Intracoronary stem cell infusion after acute myocardial infarction: a meta-analysis and update on clinical trials. *Circ Cardiovasc Interv*. 2014 Apr;7(2):156-67.
  259. Clifford DM, Fisher SA, Brunskill SJ, Doree C, Mathur A, Clarke MJ, Watt SM, Martin-Rendon E. Long-term effects of autologous bone marrow stem cell treatment in acute myocardial infarction: factors that may influence outcomes. *PLoS One*. 2012;7(5):e37373.
  260. Jeong H, Yim HW, Cho Y, Park HJ, Jeong S, Kim HB, Hong W, Kim H. The effect of rigorous study design in the research of autologous bone marrow-derived mononuclear cell transfer in patients with acute myocardial infarction. *Stem Cell Res Ther*. 2013 Jul 12;4(4):82.
  261. Francis DP, Mielewicz M, Zargaran D, Cole GD. Autologous bone marrow-derived stem cell therapy in heart disease: discrepancies and contradictions. *Int J Cardiol*. 2013 Oct 9;168(4):3381-403.
  262. Nowbar AN, Mielewicz M, Karavassilis M, Dehbi HM, Shun-Shin MJ, Jones S, Howard JP, Cole GD, Francis DP; DAMASCENE writing group. Discrepancies in autologous bone marrow stem cell trials and enhancement of ejection fraction (DAMASCENE): weighted regression and meta-analysis. *BMJ*. 2014 Apr 28;348:g2688.
  263. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Sun JP. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2004 Jul 1;94(1):92-5.
  264. Katritsis DG, Sotiropoulou PA, Karvouni E, Karabinos I, Korovesis S, Perez SA, Vouridis EM, Papamichail M. Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem

- cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2005 Jul;65(3):321-9.
265. Yang Z, Zhang F, Ma W, Chen B, Zhou F, Xu Z, Zhang Y, Zhang D, Zhu T, Wang L, Wang H, Ding Z, Zhang Y. A novel approach to transplanting bone marrow stem cells to repair human myocardial infarction: delivery via a noninfarct-related artery. *Cardiovasc Ther.* 2010 Dec;28(6):380-5.
266. Gao LR, Pei XT, Ding QA, Chen Y, Zhang NK, Chen HY, Wang ZG, Wang YF, Zhu ZM, Li TC, Liu HL, Tong ZC, Yang Y, Nan X, Guo F, Shen JL, Shen YH, Zhang JJ, Fei YX, Xu HT, Wang LH, Tian HT, Liu da Q, Yang Y. A critical challenge: dosage-related efficacy and acute complication intracoronary injection of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2013 Oct 9;168(4):3191-9.
267. Lee JW, Lee SH, Youn YJ, Ahn MS, Kim JY, Yoo BS, Yoon J, Kwon W, Hong IS, Lee K, Kwan J, Park KS, Choi D, Jang YS, Hong MK. A randomized, open-label, multicenter trial for the safety and efficacy of adult mesenchymal stem cells after acute myocardial infarction. *J Korean Med Sci.* 2014 Jan;29(1):23-31.
268. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, Gerstenblith G, DeMaria AN, Denktas AE, Gammon RS, Hermiller JB Jr, Reisman MA, Schaer GL, Sherman W. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Dec 8;54(24):2277-86.
269. Houtgraaf JH, den Dekker WK, van Dalen BM, Springeling T, de Jong R, van Geuns RJ, Geleijnse ML, Fernandez-Aviles F, Zijlstra F, Serruys PW, Duckers HJ. First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2012 Jan 31;59(5):539-40.
270. Gao LR, Chen Y, Zhang NK, Yang XL, Liu HL, Wang ZG, Yan XY, Wang Y, Zhu ZM, Li TC, Wang LH, Chen HY, Chen YD, Huang CL, Qu P, Yao C, Wang B, Chen GH, W. Z., Xu ZY, Bai J, Lu D, Shen YH, Guo F, Liu MY, Yang Y, Ding YC, Yang Y, Tian HT, Ding QA, Li LN, Yang XC, Hu X. Intracoronary infusion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial. *BMC Med.* 2015 Jul 10;13:162.
271. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, C. L., Marbán L, Mendizabal A, Johnston PV, Russell SD, Schuleri KH, Lardo AC, Gerstenblith G, Marbán E. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet.* 2012 Mar 10;379(9819):895-904.
272. Malliaras K, Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Wu E, Bonow RO, M. L., Mendizabal A, Cingolani E, Johnston PV, Gerstenblith G, Schuleri KH, Lardo AC, Marbán E. Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (CARDiosphere-Derived aUTologous stem CELls to reverse ventricUlar dySfunction). *J Am Coll Cardiol.* 2014 Jan 21;63(2):110-22.

273. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cellimplantation. *Lancet*. 2003 Jan 4;361(9351)47-9.
274. Fuchs S, Satler LF, Kornowski R, Okubagzi P, Weisz G, Baffour R, Waksman R, Weissman NJ, Cerqueira M, Leon MB, Epstein SE. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study. *J Am Coll Cardiol*. 2003 May 21;41(10)1721-4.
275. Briguori C, Reimers B, Sarais C, Napodano M, Pascotto P, Azzarello G, B. & M, Porcellini A, Vinante O, Zanco P, Peschle C, Condorelli G, Colombo A. Direct intramyocardial percutaneous delivery of autologous bone marrow in patients with refractory myocardial angina. *Am Heart J*. 2006 Mar;151(3)674-80.
276. Beeres SL, Bax JJ, Kaandorp TA, Zeppenfeld K, Lamb HJ, D.-S. P. & Stokkel MP, Fibbe WE, de Roos A, van der Wall EE, Schalij MJ, Atsma DE. Usefulness of intramyocardial injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with severe angina pectoris and stress-induced myocardial ischemia. *Am J Cardiol*. 2006 May 1;97(9)1326-31.
277. Tse HF, Thambar S, Kwong YL, Rowlings P, Bellamy G, McCrohon J, T. P., Bastian B, Chan JK, Lo G, Ho CL, Chan WS, Kwong RY, Parker A, Hauser TH, Chan J, Fong DY, Lau CP. Prospective randomized trial of direct endomyocardial implantation of bone marrow cells for treatment of severe coronary artery diseases (PROTECT-CAD trial). *Eur Heart J*. 2007 Dec;28(24)2998-3005.
278. Losordo DW, Schatz RA, White CJ, Udelson JE, Veereshwarayya V, Durgin M, Poh KK, Weinstein R, Kearney M, Chaudhry M, Burg A, Eaton L, Heyd L, Thorne T, Shturman L, Hoffmeister P, Story K, Zak V, Dowling D, Traverse JH, Olson RE, Flanagan J, Sodano D, Murayama T, Kawamoto A, Kusano KF, Wollins J, Welt F, Shah P, Soukas P, Asahara T, Henry TD. Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation*. 2007 Jun 26;115(25):3165-72.
279. Van Ramshorst J, Bax JJ, Beeres SL, Dibbets-Schneider P, Roes SD, S. M. & de Roos A, Fibbe WE, Zwaginga JJ, Boersma E, Schalij MJ, Atsma DE. Intramyocardial bone marrow cell injection for chronic myocardial ischemia: a randomized controlled trial. *J. JAMA*. 2009 May 20;301(19)1997-2004.
280. Losordo DW, Henry TD, Davidson C, Sup Lee J, Costa MA, Bass T, Mendelsohn F, Fortuin FD, Pepine CJ, Traverse JH, Amrani D, Ewenstein BM, Riedel N, Story K, Barker K, Povsic TJ, Harrington RA, Schatz RA; ACT34-CMI Investigators. Intramyocardial, autologous CD34+ cell therapy for refractory angina. *Circ Res*. 2011 Aug 5;109(4):428-36.
281. Povsic TJ, Junge C, Nada A, Schatz RA, Harrington RA, Davidson CJ, Fortuin FD, Kereiakes DJ, Mendelsohn FO, Sherman W, Schaer GL, White CJ, Stewart D, Story K, Losordo DW, Henry TD. A phase 3, randomized, double-blinded, active-controlled, unblinded standard of care study assessing the efficacy and safety of intramyocardial

- autologous CD34+ cell administration in patients with refractory angina: design of the RENEW study. *Am Heart J.* 2013 Jun;165(6):854-861.e2.
282. Wang S, Cui J, Peng W, Lu M. Intracoronary autologous CD34+ stem cell therapy for intractable angina. *Cardiology.* 2010;117(2):140-7.
283. Patel AN, Geffner L, Vina RF, Saslavsky J, Urschel HC Jr, Kormos R, Benetti F. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: a prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005 Dec;130(6):1631-8.
284. Stamm C, Kleine HD, Choi YH, Dunkelmann S, Lauffs JA, Lorenzen B, D. A. & Liebold A, Nienaber C, Zurakowski D, Freund M, Steinhoff G. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007 Mar;133(3):717-25.
285. Zhao Q, Sun Y, Xia L, Chen A, Wang. Z. Randomized study of mononuclear bone marrow cell transplantation in patients with coronary surgery. *Ann Thorac Surg.* 2008 Dec;86(6):1833-40.
286. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, R. M., Carvalho AC, Dutra HS, Dohmann HJ, Silva GV, Belém L, Vivacqua R, Rangel FO, Esporcatte R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JA, Mesquita ET, Willerson JT. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation.* 2003 May 13;107(18):2294-302.
287. Perin EC, Silva GV, Henry TD, Cabreira-Hansen MG, Moore WH, Coulter SA, Herlihy JP, Fernandes MR, Cheong BY, Flamm SD, Traverse JH, Zheng Y, Smith D, Shaw S, Westbrook L, Olson R, Patel D, Gahremanpour A, Canales J, Vaughn WK, Willerson JT. A randomized study of transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells and cell function analysis in ischemic heart failure (FOCUS-HF). *Am Heart J.* 2011 Jun;161(6):1078-87.e3.
288. Perin EC, Willerson JT, Pepine CJ, Henry TD, Ellis SG, Zhao DX, Silva GV, Lai D, Thomas JD, Kronenberg MW, Martin AD, Anderson RD, Traverse JH, Penn MS, Anwaruddin S, Hatzopoulos AK, Gee AP, Taylor DA, Cogle CR, Smith D, Westbrook L, Chen J, Handberg E, Olson RE, Geither C, Bowman S, Francescon J, Baraniuk S, Piller LB, Simpson LM, Loghin C, Aguilar D, Richman S, Zierold C, Bettencourt J, Sayre SL, Vojvodic RW, Skarlatos SI, Gordon DJ, Ebert RF, Kwak M, Moyé LA, Simari RD; Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTRN). Effect of transendocardial delivery of autologous bone marrow mononuclear cells on functional capacity, left ventricular function, and perfusion in chronic heart failure: the FOCUS-CCTRN trial. *JAMA.* 2012 Apr 25;307(16):1717-26.
289. Pokushalov E, Romanov A, Chernyavsky A, Larionov P, Terekhov I, Artyomenko S, Poveshenko O, Kliver E, Shirokova N, Karaskov A, Dib N. Efficiency of intramyocardial injections of autologous bone marrow mononuclear cells in patients with ischemic heart failure: a randomized study. *J Cardiovasc Transl Res.* 2010 Apr;3(2):160-8.

290. Heldman AW, DiFede DL, Fishman JE, Zambrano JP, Trachtenberg BH, Karantalis V, Mushtaq M, Williams AR, Suncion VY, McNiece IK, Gherlin E, Soto V, Lopera G, Miki R, Willens H, Hendel R, Mitrani R, Pattany P, Feigenbaum G, Oskouei B, Byrnes J, Lowery MH, Sierra J, Pujol MV, Delgado C, Gonzalez PJ, Rodriguez JE, Bagnoli LL, Rouy D, Altman P, Foo CW, da Silva J, Anderson E, Schwarz R, Mendizabal A, Hare JM. Transendocardial mesenchymal stem cells and mononuclear bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TAC-HFT randomized trial. *JAMA*. 2014 Jan 1;311(1):62-73.
291. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Bartsch T, Schannwell C, Antke C, Sorg RV, K. & G, Wernet P, Müller HW, Kosterling M. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT Study. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Nov 1;46(9):1651-8.
292. Strauer BE, Yousef M, Schannwell CM. The acute and long-term effects of intracoronary Stem cell Transplantation in 191 patients with chronic heart failure: the STAR-heart study. *Eur J Heart Fail*. 2010 Jul;12(7):721-9.
293. Assmus B, Honold J, Schächinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Abolmaali ND, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006 Sep 21;355(12):1222-32.
294. Assmus B, Fischer-Rasokat U, Honold J, Seeger FH, Fichtlscherer S, T. T. & Seifried E, Schächinger V, Dimmeler S, Zeiher AM. TOPCARE-CHD Registry. Transcoronary transplantation of functionally competent BMCs is associated with a decrease in natriuretic peptide serum levels and improved survival of patients with chronic postinfarction heart failure: results of the TOPCARE-CHD Re. *Circ Res*. 2007 Apr 27;100(8):1234-41.
295. Kandala J, Upadhyay GA, Pokushalov E, Wu S, Drachman DE, Singh JP. Meta-analysis of stem cell therapy in chronic ischemic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2013 Jul 15;112(2):217-25.
296. Fisher SA, Dorée C, Brunskill SJ, Mathur A, Martin-Rendon E. Bone Marrow Stem Cell Treatment for Ischemic Heart Disease in Patients with No Option of Revascularization: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2013 Jun 19;8(6):e64669.
297. Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A, Wetzel K, Edge AS, Jacoby DB, D. & JH, Wright S, Aretz TH, Eisen HJ, Aaronson KD. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Mar 5;41(5):879-88.
298. Menasché P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, B. A., Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Apr 2;41(7):1078-83.

299. Hagège AA, Marolleau JP, Vilquin JT, Alhéritière A, Peyrard S, Duboc D, Abergel E, Messas E, Mousseaux E, Schwartz K, Desnos M, Menasché P. Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation*. 2006 Jul 4;114(1 Suppl):I108-13.
300. Dib N, Michler RE, Pagani FD, Wright S, Kereiakes DJ, Lengerich R, Binkley P, Buchele D, Anand I, Swingen C, Di Carli MF, Thomas JD, Jaber WA, Opie SR, Campbell A, McCarthy P, Yeager M, Dilsizian V, Griffith BP, Korn R, Kreuger SK, Ghazoul M, MacLellan WR, Fonarow G, Eisen HJ, Dinsmore J, Diethrich E. Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: four-year follow-up. *Circulation*. 2005 Sep 20;112(12):1748-55.
301. Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, Vilquin JT, Marolleau JP, Seymour B, Larghero J, Lake S, Chatellier G, Solomon S, Desnos M, Hagège AA. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation*. 2008 Mar 4;117(9):1189-200.
302. Duckers HJ, Houtgraaf J, Hehrlein C, Schofer J, Waltenberger J, Gershlick A, Bartunek J, Nienaber C, Macaya C, Peters N, Smits P, Siminiak T, van Mieghem W, Legrand V, Serruys PW. Final results of a phase IIa, randomised, open-label trial to evaluate the percutaneous intramyocardial transplantation of autologous skeletal myoblasts in congestive heart failure patients: the SEISMIC trial. *EuroIntervention*. 2011 Feb;6(7):805-12.
303. Chen S, Liu Z, Tian N, Zhang J, Yei F, Duan B, Zhu Z, Lin S, Kwan TW. Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery. *J Invasive Cardiol*. 2006 Nov;18(11):552-6.
304. Williams AR, Trachtenberg B, Velazquez DL, McNiece I, Altman P, Rouy D, Mendizabal AM, Pattany PM, Lopera GA, Fishman J, Zambrano JP, Heldman AW, Hare JM. Intramyocardial stem cell injection in patients with ischemic cardiomyopathy: functional recovery and reverse remodeling. *Circ Res*. 2011 Apr 1;108(7):792-6.
305. Chin SP, Poey AC, Wong CY, Chang SK, Tan CS, Ng MT, Chew KH, Lam KH, Cheong SK. Intramyocardial and intracoronary autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in chronic severe dilated cardiomyopathy. *Cytotherapy*. 2011 Aug;13(7):814-21.
306. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, S., VY, Tracy M, Ghersin E, Johnston PV, Brinker JA, Breton E, D.-S. J., Schulman IH, Byrnes J, Mendizabal AM, Lowery MH, Rouy D, Altman P, Wong Po Foo C, Ruiz P, Amador A, Da Silva J, McNiece IK, Heldman AW, George R, Lardo A. Comparison of allogeneic vs. autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA*. 2012 Dec 12;308(22):2369-79.

307. Mathiasen, A. Autotransplantation of bone marrow derived mesenchymal stromal cells in patients with severe ischemic heart failure: the MSC-HF trial. in Present. Am. Coll. Cardiol. Sci. Sess. March 31, 2014; Washington, DC
308. Karantalis V, DiFede DL, Gerstenblith G, Pham S, Symes J, Zambrano JP, F., J, Pattany P, McNiece I, Conte J, Schulman S, Wu K, Shah A, B. E., Davis-Sproul J, Schwarz R, Feigenbaum G, Mushtaq M, Suncion VY, Lardo AC, Borrello I, Mendizabal A, Karas TZ, Byrnes J, Lowery M, Heldman AW, Hare JM. Autologous mesenchymal stem cells produce concordant improvements in regional function, tissue perfusion, and fibrotic burden when administered to patients undergoing coronary artery bypass grafting: The Prospective Randomized Study of Mesenchymal Stem Cells. *Circ Res.* 2014 Apr 11;114(8):1302-10.
309. Bartunek J, Behfar A, Dolatabadi D, Vanderheyden M, Ostojic M, Dens J, El Nakadi B, Banovic M, Beleslin B, Vrolix M, Legrand V, Vrints C, Vanoverschelde JL, Crespo-Diaz R, Homsy C, Tendera M, Waldman S, Wijns W, Terzic A. Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure: the C-CURE (Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failURE) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics. *J Am Coll Cardiol.* 2013 Jun 11;61(23):2329-38.
310. Mathiasen AB, Haack-Sørensen M, Jørgensen E, Kastrup J. Autotransplantation of mesenchymal stromal cells from bone-marrow to heart in patients with severe stable coronary artery disease and refractory angina--final 3-year follow-up. *Int J Cardiol.* 2013 Dec 10;170(2):246-51.
311. Perin EC, Sanz-Ruiz R, Sánchez PL, Lasso J, Pérez-Cano R, Alonso-Farto JC, Pérez-David E, Fernández-Santos ME, Serruys PW, Duckers HJ, Kastrup J, Chamuleau S, Zheng Y, Silva GV, Willerson JT, Fernández-Avilés F. Adipose-derived regenerative cells in patients with ischemic cardiomyopathy: The PRECISE Trial. *Am Heart J.* 2014 Jul;168(1):88-95.e2.
312. IBoilli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, B. G., Wagner SG, Leri A, Hosoda T, Sanada F, Elmore JB, Goichberg P, Cappetta D, Solankhi NK, Fahsah I, Rokosh DG, Slaughter MS, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet.* 2011 Nov 26;378(9806):1847-57.
313. The Lancet Editors. Expression of concern: the SCIPIO trial. *Lancet.* 2014 Apr 12;383(9925):1279.
314. Takehara N, Nagata M, Ogata T, Nakamura T, Matoba S, Gojo S, Sawada T, Yaku H, M. H. The ALCADIA (Autologous Human Cardiac-derived Stem Cell To Treat Ischemic Cardiomyopathy) trial. *AHA* 2012; LBCT-20032.
315. Seth S, Narang R, Bhargava B, Ray R, Mohanty S, Gulati G, Kumar L, Reddy KS, Venugopal P; AIIMS Cardiovascular Stem Cell Study Group. Percutaneous intracoronary cellular cardiomyoplasty for nonischemic cardiomyopathy: clinical and histopathological results: the first-in-man ABCD (Autologous Bone Marrow Cells in Dilated Cardiomyopathy) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Dec 5;48(11):2350-1.



316. Fischer-Rasokat U, Assmus B, Seeger FH, Honold J, Leistner D, Fichtlscherer S, Schächinger V, Tonn T, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. A pilot trial to assess potential effects of selective intracoronary bone marrow-derived progenitor cell infusion in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy: final 1-year results of the transplantation of progenitor cells and functional regeneration enhancement pilot trial in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circ Heart Fail*. 2009 Sep;2(5):417-23.
317. Bocchi EA, Bacal F, Guimarães G, Mendroni A, Mocelin A, Filho AE, Dore da Cruz Fd, Resende MC, Chamone D. Granulocyte-colony stimulating factor or granulocyte-colony stimulating factor associated to stem cell intracoronary infusion effects in non ischemic refractory heart failure. *Int J Cardiol*. 2010 Jan 7;138(1):94-7.
318. Vrtovec B, Poglajen G, Sever M, Lezaic L, Domanovic D, Cernelc P, Haddad F, Torre-Amione G. Effects of intracoronary stem cell transplantation in patients with dilated cardiomyopathy. *J Card Fail*. 2011 Apr;17(4):272-81.
319. Vrtovec B, Poglajen G, Lezaic L, Sever M, Domanovic D, Cernelc P, Socan A, Schrepfer S, Torre-Amione G, Haddad F, Wu JC. Effects of intracoronary CD34+ stem cell transplantation in nonischemic dilated cardiomyopathy patients: 5-year follow-up. *Circ Res*. 2013 Jan 4;112(1):165-73.
320. Wang JA, Xie XJ, He H, Sun Y, Jiang J, Luo RH, Fan YQ, Dong L. [A prospective, randomized, controlled trial of autologous mesenchymal stem cells transplantation for dilated cardiomyopathy]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2006 Feb;34(2):107-10.
321. Xiao WT, Gao LJ, Gao CY, Gao YJ, Dai GY, Li MW, W. X. [Comparative study on the efficacy of intracoronary infusion with various types of autologous bone marrow stem cells for patients with dilated cardiomyopathy]. *Xue, Zhonghua Xin Jul*;40(7):575-8., *Guan Bing Za Zhi*. 2012
322. Peter Lanzer, E. T. Pan Vascular Medicine- Integrated Clinical Management. Springer 2002
323. Chilian WM, Eastham CL, Marcus ML. Microvascular distribution of coronary vascular resistance in beating left ventricle. *Am J Physiol*. 1986 Oct;251(4 Pt 2):H779-88.
324. Dole WP. Autoregulation of the coronary circulation. *Prog Cardiovasc Dis*. 1987 Jan-Feb;29(4):293-323.
325. Feliciano L, Henning RJ. Coronary artery blood flow: physiologic and pathophysiologic regulation. *Clin Cardiol*. 1999 Dec;22(12):775-86.
326. Muller-Delp, J. M. Coronary Microcirculation in Health and Disease. *ISRN Physiology*, vol. 2013, Article ID 238979, 24 pages, 2013. *ISRN Physiol*. vol. 2013, Artic. ID 238979, 24 p, 2013.
327. Maseri A, Crea F, Kaski JC, Crake T. Mechanisms of angina pectoris in syndrome X. *J Am Coll Cardiol*. 1991 Feb;17(2):499-506.

328. Bekkers SC, Yazdani SK, Virmani R, Waltenberger J. Microvascular obstruction: underlying pathophysiology and clinical diagnosis. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Apr 20;55(16):1649-60.
329. Neglia D, Michelassi C, Trivieri MG, Sambuceti G, Giorgetti A, P. L., Gallopin M, Salvadori P, Sorace O, Carpeggiani C, Poddighe R, L'Abbate A, Parodi O. Prognostic role of myocardial blood flow impairment in idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2002 Jan 15;105(2):186-93.
330. Murthy VL, Naya M, Foster CR, Gaber M, Hainer J, Klein J, Dorbala S, Blankstein R, Di Carli MF. Association between coronary vascular dysfunction and cardiac mortality in patients with and without diabetes mellitus. *Circulation*. 2012 Oct 9;126(15):1858-68.
331. Heusch G. Coronary microcirculation. *Circ J*. 2014;78(8):1830-1.
332. Smart N, Riley PR. The stem cell movement. *Circ Res*. 2008 May 23;102(10):1155-68.
333. Papayannopoulou, T. Bone marrow homing: the players, the playfield, and their evolving roles. *Curr Opin Hematol*. 2003; 10 214–219.
334. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, Rovner A, Ellis SG, Thomas JD, DiCorleto PE, Topol EJ, Penn MS. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, Rovner A, Ellis SG, Thomas JD, DiCorleto PE, Topol EJ, Penn M.S Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*. 2003; 362 697–703.
335. Ip JE, Wu Y, Huang J, Zhang L, Pratt RE, Dzau VJ. Mesenchymal stem cells use integrin beta1 not CXC chemokine receptor 4 for myocardial Migration and engraftment. *Mol Biol Cell*. 2007; 18 2873–2882.
336. Erbs S, Linke A, Schächinger V, Assmus B, Thiele H, Diederich KW, Hoffmann C, Dimmeler S, Tonn T, Hambrecht R, Zeiher AM, Schuler G. Restoration of microvascular function in the infarct-related artery by intracoronary transplantation of bone marrow progenitor cells in patients with acute myocardial infarction: the Doppler Substudy of the Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction (REPAIR-AMI) trial. *Circulation*. 2007 Jul 24;116(4):366-74.
337. Schächinger V, Assmus B, Honold J, Lehmann R, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. Normalization of coronary blood flow in the infarct-related artery after intracoronary progenitor cell therapy: intracoronary Doppler substudy of the TOPCARE-AMI trial. *Clin Res Cardiol*. 2006 Jan;95(1):13-22.
338. Kern MJ. Coronary physiology revisited: practical insights from the cardiac catheterization laboratory. *Circ*. 2000 Mar 21;101(11):1344-51.
339. Pijls NH, De Bruyne B, Peels K, Van Der Voort PH, Bonnier HJ, Bartunek J, Koolen JJ, Koolen JJ Measurement of fractional flow reserve to assess the functional severity of coronary-artery stenoses. *N Engl J Med*. 1996;334(26):1703-708.

340. Groves EM, Seto AH, Kern MJ. Invasive Testing for Coronary Artery Disease: FFR, IVUS, OCT, NIRS. *Cardiol Clin*. 2014 Aug;32(3):405-417.
341. Knaapen P, Camici PG, Marques KM, Nijveldt R, Bax JJ, Westerhof N, Götte MJ, Jerosch-Herold M, Schelbert HR, Lammertsma AA, van Rossum AC. Coronary microvascular resistance: methods for its quantification in humans. *Basic Res Cardiol*. 2009 Sep;104(5):485-98.
342. De Bruyne B, Bartunek J, Sys SU, Pijls NH, Heyndrickx GR, Wijns W. Simultaneous coronary pressure and flow velocity measurements in humans. Feasibility, reproducibility, and hemodynamic dependence of coronary flow velocity reserve, hyperemic flow versus pressure slope index, and fractional flow reserve. *Circulation*. 1996 Oct 15;94(8):1842-9.
343. Fearon WF, Balsam LB, Farouque HM, Caffarelli AD, Robbins RC, Fitzgerald PJ, Yock PG, Yeung AC. Novel index for invasively assessing the coronary microcirculation. *Circulation*. 2003 Jul 1;107(25):3129-32.
344. Ng MK, Yeung AC, Fearon WF. Invasive assessment of the coronary microcirculation: superior reproducibility and less hemodynamic dependence of index of microcirculatory resistance compared with coronary flow reserve. *Circulation*. 2006 May 2;113(17):2054-61.
345. De Bruyne B, Pijls NH, Barbato E, Bartunek J, Bech JW, Wijns W, Heyndrickx GR. Intracoronary and intravenous adenosine 5'-triphosphate, adenosine, papaverine, and contrast medium to assess fractional flow reserve in humans. *Circulation*. 2003 Apr 15;107(14):1877-83.
346. Solberg OG, Ragnarsson A, Kvarsnes A, Endresen K, Kongsgård E, Aakhus S, Gullestad L, Stavem K, Aaberge L. Reference interval for the index of coronary microvascular resistance. *EuroIntervention*. 2014 Jan 22;9(9):1069-75.
347. Melikian N, Vercauteren S, Fearon WF, Cuisset T, MacCarthy PA, D. G., Aarnoudse W, Bartunek J, Vanderheyden M, Wyffels E, Wijns W, Heyndrickx GR, Pijls NH, de Bruyne B. Quantitative assessment of coronary microvascular function in patients with and without epicardial atherosclerosis. *EuroIntervention*. 2010 Apr;5(8):939-45.
348. Fearon WF, Shah M, Ng M, Brinton T, Wilson A, Tremmel JA, Schnittger I, Lee DP, Vagelos RH, Fitzgerald PJ, Yock PG, Yeung AC. Predictive value of the index of microcirculatory resistance in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2008 Feb 5;51(5):560-5.
349. Varga OE, Hansen AK, Sandøe P, Olsson IA. Validating animal models for preclinical research: a scientific and ethical discussion. *Altern Lab Anim*. 2010 Jun;38(3):245-8.
350. Fox J, Barthold S, Davison M, Newcomer C, Quimby F, Smith A, E. *The Mouse in Biomedical Research*. Volume 1–4, Second Edition (American College of Laboratory Animal Medicine). Burlington, MA: Elsevier; 2007. Vol. 1–4, Second Ed. (American Coll. Lab. Anim. Med. Burlington, MA Elsevier; 2007

351. Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, Nikol S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res.* 2007 Apr 1;74(1)29-38.
352. Hamlin RL, Altschuld RA. Extrapolation from mouse to man. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2011 Jan;4(1)2-4.
353. Nadal-Ginard B, Torella D, Ellison G. Cardiovascular Regenerative Medicine at the Crossroads. *Clinical Trials of Cellular Therapy Must Now Be Based on Reliable Experimental Data From Animals With Characteristics Similar to Human's.* *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* 2006;59(11)1175-89.
354. Suzuki Y, Yeung AC, Ikeno F. The representative porcine model for human cardiovascular disease. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:195483.
355. Hearse DJ, Sutherland FJ. Experimental models for the study of cardiovascular function and disease. *Pharmacol Res.* 2000 Jun;41(6)597-603.
356. Swindle MM, Horneffer PJ, Gardner TJ, Gott VL, Hall TS, Stuart RS, Baumgartner WA, Borkon AM, Galloway E, Reitz BA. Anatomic and anesthetic considerations in experimental cardiopulmonary surgery in swine. *Lab Anim Sci.* 1986 Aug;36(4)357-61.
357. Hughes GC, Post MJ, Simons M, Annex BH. Translational physiology: porcine models of human coronary artery disease: implications for preclinical trials of therapeutic angiogenesis. *J Appl Physiol (1985).* 2003 May;94(5):1689-701.
358. Vodicka P, Smetana K Jr, Dvoránková B, Emerick T, Xu YZ, Ourednik J, Ourednik V, Motlik J. The miniature pig as an animal model in biomedical research. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 May;1049:161-71.
359. Dos Santos F, Andrade PZ, Eibes G, da Silva CL, Cabral JM. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells on microcarriers. *Methods Mol Biol.* 2011;698:189-98.
360. Santos Fd, Andrade PZ, Abecasis MM, Gimble JM, Chase LG, Campbell AM, B. & S, Vemuri MC, Silva CL, Cabral JM. Toward a clinical-grade expansion of mesenchymal stem cells from human sources: a microcarrier-based culture system under xeno-free conditions. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011 Dec;17(12)1201-10.
361. Sensebé L, Bourin P, Tarte K. Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. *Hum Gene Ther.* 2011 Jan;22(1)19-26.
362. Niccoli G, Burzotta F, Galiuto L, Crea F. Myocardial no-reflow in humans. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Jul 21;54(4):281-92.
363. Jones E, Eteiba W, Merz NB. Cardiac syndrome X and microvascular coronary dysfunction. *Trends Cardiovasc Med.* 2012 Aug;22(6):161-8.
364. Layland J, Whitbourn R, Macisaac A, Somaratne J, Wilson A. Takotsubo cardiomyopathy: reversible elevation in microcirculatory resistance. *Cardiovasc Revasc Med.* 2012 Jan-Feb;13(1):66-8.

365. Gupta R, Tongers J, Losordo DW. Human studies of angiogenic gene therapy. *Circ Res*. 2009 Oct 9;105(8):724-36.
366. Kassab GS, Fung YC. Topology and dimensions of pig coronary capillary network. *Am J Physiol*. 1994 Jul;267(1 Pt 2):H319-25.
367. Wilson RF, Wyche K, Christensen BV, Zimmer S, Laxson DD. Effects of adenosine on human coronary arterial circulation. *Circulation*. 1990 Nov;82(5):1595-606.
368. Jeremias A, Filardo SD, Whitbourn RJ, Kernoff RS, Yeung AC, Fitzgerald PJ, Yock PG. Effects of intravenous and intracoronary adenosine 5'-triphosphate as compared with adenosine on coronary flow and pressure dynamics. *Circulation*. 2000 Jan 25;101(3):318-23.
369. Aarnoudse W, Fearon WF, Manoharan G, Geven M, van de Vosse F, Rutten M, De Bruyne B, Pijls NH. Epicardial stenosis severity does not affect minimal microcirculatory resistance. *Circulation*. 2004 Oct 12;110(15):2137-42.
370. Kudo M, Wang Y, Wani MA, Xu M, Ayub A, Ashraf M. Implantation of bone marrow stem cells reduces the infarction and fibrosis in ischemic mouse heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2003 Sep;35(9):1113-9.
371. Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, Kloner RA. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation*. 2005 Jul 12;112(2):214-23.
372. Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, Amado LC, Martin BJ, Pittenger MF, Hare JM, Bulte JW. In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Circulation*. 2003 May 13;107(18):2290-3.
373. Bartunek J, Behfar A, Dolatabadi D, Vanderheyden M, Ostojic M, Dens J, El Nakadi B, Banovic M, Beleslin B, Vrolix M, Legrand V, Vrints C, Vanoverschelde JL, Crespo-Diaz R, Homsy C, Tendera M, Waldman S, Wijns W, Terzic A. Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure: the C-CURE (Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failURE) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Jun 11;61(23):2329-38.
374. Wang D, Jin Y, Ding C, Zhang F, Chen M, Yang B, Shan Q, Zou J, Cao K. Intracoronary delivery of mesenchymal stem cells reduces proarrhythmogenic risks in swine with myocardial infarction. *Ir J Med Sci*. 2011 Jun;180(2):379-85.
375. Houtgraaf JH, de Jong R, Kazemi K, de Groot D, van der Spoel TI, Arslan F, Hoefer I, Pasterkamp G, Itescu S, Zijlstra F, Geleijnse ML, Serruys PW, Duckers HJ. Intracoronary infusion of allogeneic mesenchymal precursor cells directly after experimental acute myocardial infarction reduces infarct size, abrogates adverse remodeling, and improves cardiac function. *Circ Res*. 2013 Jul 5;113(2):153-66.
376. Llano R, Epstein S, Zhou R, Zhang H, Hamamdžić D, Keane MG, Freyman T, Wilensky RL. Intracoronary delivery of mesenchymal stem cells at high flow rates after

- myocardial infarction improves distal coronary blood flow and decreases mortality in pigs. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2009 Feb 1;73(2):251-7.
377. Hong SJ, Hou D, Brinton TJ, Johnstone B, Feng D, Rogers P, Fearon WF, Yock P, March KL. Intracoronary and retrograde coronary venous myocardial delivery of adipose-derived stem cells in swine infarction lead to transient myocardial trapping with predominant pulmonary redistribution. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2014 Jan 1;83(1):E17-25.
  378. Koudstaal S, Jansen Of Lorkeers SJ, van Slochteren FJ, van der Spoel TI, V. & de Hoef TP, Sluijter JP, Siebes M, Doevendans PA, Piek JJ, Chamuleau S. Assessment of coronary microvascular resistance in the chronic infarcted pig heart. *J Cell Mol Med.* 2013 Sep;17(9):1128-35.
  379. McGeoch R, Watkins S, Berry C, Steedman T, Davie A, Byrne J, Hillis S, Lindsay M, Robb S, Dargie H, Oldroyd K. The index of microcirculatory resistance measured acutely predicts the extent and severity of myocardial infarction in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Interv.* 2010 Jul;3(7):715-22.
  380. Yoo SH, Yoo TK, Lim HS, Kim MY, Koh JH. Index of microcirculatory resistance as predictor for microvascular functional recovery in patients with anterior myocardial infarction. *J Korean Med Sci.* 2012 Sep;27(9):1044-50.
  381. Kitabata H, Kubo T, Ishibashi K, Komukai K, Tanimoto T, Ino Y, K. M., Ozaki Y, Shiono Y, Shimamura K, Orii M, Hirata K, Tanaka A, Imanishi T, Akasaka T. Prognostic value of microvascular resistance index immediately after primary percutaneous coronary intervention on left ventricular remodeling in patients with reperfused anterior acute ST-segment elevation myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Interv.* 2013 Oct;6(10):1046-54.
  382. Fearon WF, Low AF, Yong AS, McGeoch R, Berry C, Shah MG, Ho MY, Kim HS, Loh JP, Oldroyd K. Prognostic value of the Index of Microcirculatory Resistance measured after primary percutaneous coronary intervention. *Circulation.* 2013 Jun 18;127(24):2436-41.
  383. Cuculi F, De Maria GL, Meier P, Dall'Armellina E, de Caterina AR, Channon KM, Prendergast BD, Choudhury RP, Forfar JC, Kharbanda RK, Banning AP. Impact of microvascular obstruction on the assessment of coronary flow reserve, index of microcirculatory resistance, and fractional flow reserve after ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2014 Nov 4;64(18):1894-904.
  384. Hoole SP, Jaworski C, Brown AJ, McCormick LM, Agrawal B, Clarke SC, West NE. Serial assessment of the index of microcirculatory resistance during primary percutaneous coronary intervention comparing manual aspiration catheter thrombectomy with balloon angioplasty (IMPACT study): a randomised controlled pilot study. *Open Heart* 2015 May 16;2(1):e000238.
  385. ilz GA, Braun J, Ulrich C, Felka T, Warstat K, Ruh M, Schewe B, Abele H, Larbi A, Aicher WK. Human mesenchymal stromal cells express CD14 cross-reactive epitopes. *Cytometry A.* 2011 Aug;79(8):635-45.

- 386. Van der Bogt KE, Schrepfer S, Yu J, Sheikh AY, Hoyt G, Govaert JA, Velotta JB, Contag CH, Robbins RC, Wu JC. Comparison of transplantation of adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the infarcted heart. *Transplantation*. 2009 Mar 15;87(5):642-52.
- 387. Dixon JA, Gorman RC, Stroud RE, Bouges S, Hirotsugu H, Gorman JH 3rd, Martens TP, Itescu S, Schuster MD, Plappert T, St John-Sutton MG, Spinale FG. Mesenchymal cell transplantation and myocardial remodeling after myocardial infarction. *Circulation*. 2009 Sep 15;120(11 Suppl):S220-9.
- 388. Hashemi SM, Ghods S, Kolodgie FD, Parcham-Azad K, Keane M, Hamamdžić D, Young R, Rippey MK, Virmani R, Litt H, Wilensky R. A placebo controlled, dose-ranging, safety study of allogeneic mesenchymal stem cells injected by endomyocardial delivery after an acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2008 Jan;29(2):251-9.





# Anexos

---



## XI. ANEXOS

### Artigo Publicado

Rev Port Cardiol. 2014;33(4):207-212



Revista Portuguesa de  
**Cardiologia**  
Portuguese Journal of **Cardiology**  
www.revportcardiol.org



#### ARTIGO ORIGINAL

### O índice de resistência microcirculação para o estudo invasivo da microcirculação coronária – descrição e validação de um modelo animal



António Fiarresga<sup>a,\*</sup>, Mafalda Selas<sup>a</sup>, Eunice Oliveira<sup>a</sup>,  
Sandra Cavaco-Gonçalves<sup>b</sup>, Duarte Cacela<sup>a</sup>, Belmira Carrapiço<sup>c</sup>,  
Nuno Cardim<sup>d</sup>, Rui Cruz Ferreira<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Serviço de Cardiologia, Hospital de Santa Marta, Centro Hospitalar de Lisboa Central, EPE, Lisboa, Portugal

<sup>b</sup> Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, IP, Lisboa, Portugal

<sup>c</sup> Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal

<sup>d</sup> Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal

Recebido a 22 de julho de 2013; aceite a 27 de setembro de 2013

Disponível na Internet a 1 de maio de 2014

#### PALAVRAS-CHAVE

Microcirculação  
coronária;  
Índice de resistência  
da microcirculação;  
Modelo animal

**Resumo** O índice de resistência da microcirculação (IRM) permite o estudo quantitativo, invasivo e em tempo real do estado da microcirculação coronária. O objetivo principal foi a validação da técnica de determinação do IRM num modelo animal de grande porte. O objetivo secundário foi a comparação de duas doses de papaverina, 5 e 10 mg, para indução de hiperémia máxima e quanto à sua evolução temporal. Foram estudados oito porcos. Avaliou-se a Pd e o Tmn em condições basais e com hiperémia máxima induzida pela injeção intracoronária de 5 ou 10 mg de papaverina e sucessivamente aos dois, cinco, oito e dez minutos. Para o compromisso da microcirculação foram injetadas microesferas de 40 µm de diâmetro. Em cada animal foram realizadas 14 determinações de IRM. Não se observaram diferenças significativas entre as duas doses de papaverina quanto às repostas da Pd e ao valor de IRM obtido,  $11 \pm 4,5$  U com 5 mg de papaverina e de  $10,6 \pm 3$  U com a dose de 10 mg ( $p = 0,612$ ). A evolução temporal dos valores de IRM foi semelhante, deixando de haver diferenças relativamente ao valor basal após cinco minutos. Com a injeção das microesferas houve uma elevação significativa do IRM ( $41 \pm 16$  U,  $p = 0,001$ ). O IRM avalia em tempo real a resistência da microcirculação coronária. A administração intracoronária de 5 mg de papaverina é tão eficaz como a de 10 mg para a indução de hiperémia máxima, com o retorno às condições basais a ocorrer cinco minutos após a sua administração.

© 2013 Sociedade Portuguesa de Cardiologia. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos os direitos reservados.

\* Autor para correspondência.

Correio eletrónico: antoniojosefiarresga@spc.pt (A. Fiarresga).

**KEYWORDS**

Coronary  
microcirculation;  
Index of  
microcirculation  
resistance;  
Animal model

# **Invasive assessment of the coronary microcirculation using the index of microcirculatory resistance: Description and validation of an animal model**

**Abstract**

**Introduction:** The index of microcirculatory resistance (IMR) enables/provides quantitative, invasive, and real-time assessment of coronary microcirculation status.

**Aims:** The primary aim of this study was to validate the assessment of IMR in a large animal model, and the secondary aim was to compare two doses of intracoronary papaverine, 5 and 10 mg, for induction of maximal hyperemia and its evolution over time.

**Methods:** Measurements of IMR were performed in eight pigs. Mean distal pressure ( $P_d$ ) and mean transit time ( $T_{mn}$ ) were measured at rest and at maximal hyperemia induced with intracoronary papaverine, 5 and 10 mg, and after 2, 5, 8 and 10 minutes. Disruption of the microcirculation was achieved by selective injection of 40- $\mu$ m microspheres via a microcatheter in the left anterior descending artery.

**Results:** In each animal 14 IMR measurements were made. There were no differences between the two doses of papaverine regarding  $P_d$  response and IMR values –  $11 \pm 4.5$  U with 5 mg and  $10.6 \pm 3$  U with 10 mg ( $p=0.612$ ). The evolution of IMR over time was also similar with the two doses, with significant differences from resting values disappearing after five minutes of intracoronary papaverine administration. IMR increased with disrupted microcirculation in all animals ( $41 \pm 16$  U,  $p=0.001$ ).

**Conclusions:** IMR provides invasive and real-time assessment of coronary microcirculation. Disruption of the microvascular bed is associated with a significant increase in IMR. A 5-mg dose of intracoronary papaverine is as effective as a 10-mg dose in inducing maximal hyperemia. After five minutes of papaverine administration there is no significant difference from resting hemodynamic status.

© 2013 Sociedade Portuguesa de Cardiologia. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

**Introdução**

Avanços na tecnologia dos sensores permitem atualmente a medição da pressão e da velocidade do fluxo coronário (por Doppler ou por termodiluição) através de um simples fio guia, possibilitando o estudo das condições hemodinâmicas de toda a circulação coronária<sup>1,2</sup>. Para a fisiopatologia de várias doenças cardíacas contribuem duas resistências: a das estenoses dos vasos epicárdicos e a da disfunção da microcirculação. Enquanto que para as primeiras existem parâmetros estabelecidos e com ampla utilização clínica (p. ex. *fractional flow reserve*, FFR), o estudo invasivo da microcirculação em tempo real e de forma exequível na prática clínica encontra-se ainda numa fase inicial<sup>3</sup>.

A reserva de fluxo coronário (RFC) é o aumento máximo do fluxo acima do que está presente em repouso. O fluxo máximo é conseguido através da hiperémia máxima induzida farmacologicamente. A RFC tem a desvantagem de não ser independente das condições hemodinâmicas de base e de fornecer informação sobre o estado da circulação epicárdica e da microcirculação, não sendo possível diferenciá-las<sup>4,5</sup>. O índice de resistência da microcirculação (IRM) ultrapassa estas limitações<sup>6</sup>. Este índice é avaliado durante a fase de fluxo máximo e é definido pela pressão coronária distal ( $P_d$ ) dividida pelo inverso do tempo médio de trânsito ( $T_{mn}$ ) durante a fase de hiperémia máxima. O  $T_{mn}$  é determinado por termodiluição. Após uma injeção intracoronária de 3 ml de soro à temperatura ambiente, a qual é detetada pela parte proximal do fio que funciona como termistor proximal, o soro flui pela coronária até ao termistor distal,

medindo-se o tempo que o soro percorreu desde o sensor proximal ao distal em várias injeções temos o  $T_{mn}$ . Este índice é extremamente reprodutível e independente da frequência cardíaca, da pressão sanguínea e da contratilidade cardíaca<sup>7</sup>.

Para o estudo pré-clínico da microcirculação o estabelecimento de um modelo animal de grande porte é fundamental. O modelo suíno será o mais indicado, dado que a vascularização cardíaca, a anatomia coronária e a rede de colaterais entre a circulação epicárdica e a endocárdica, pobre em comparação com outros animais, são semelhantes à humana<sup>8,9</sup>, o que o torna no melhor modelo animal para estudar a microcirculação.

Um passo chave para a correta avaliação do IRM consiste na indução da hiperémia máxima, que é o resultado da vasodilatação generalizada da árvore coronária. Para a obtenção desta vasodilatação são utilizados fármacos vasodilatadores dos pequenos vasos, sendo a adenosina intravenosa ou a papaverina intracoronária os mais eficazes<sup>10</sup>. Contudo, os estudos em animais têm utilizado doses diversas destes fármacos, não estando ainda definida qual a correta ou se existe um efeito de dose a ser considerado na interpretação dos seus resultados.

A complexidade da investigação animal associada à própria técnica de determinação do IRM aconselham uma necessária validação destes modelos antes da utilização do seu potencial para o estudo da fisiopatologia da doença cardíaca ou para a avaliação dos efeitos de determinada terapêutica na microcirculação.



## Objetivos

O objetivo principal foi a validação da técnica de determinação do IRM num modelo animal de grande porte. O objetivo secundário foi a comparação de duas doses de papaverina, 5 e 10 mg, para indução de hiperémia máxima, quanto ao valor de IRM obtido e à sua evolução temporal.

## Métodos

Foram utilizados oito suínos cruzados machos *Duroc* e fêmeas *F1 Large White X Landrace*, com peso vivo entre 25-40 Kg ( $32 \pm 5$  Kg). O estudo foi aprovado pela Comissão de ética e bem-estar animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa e os animais foram tratados respeitando as normas de utilização humanitária e bem-estar. Os animais utilizados neste estudo não foram sacrificados. Assim, durante o recobro de 24 horas foi feita analgesia com 2 mg/kg p.v. de carprofeno (*Rimadyl*, Pfizer) e antibioticoterapia com 15 mg/kg p.v. de amoxicilina (*Clamoxyl L. A.*, Pfizer), não tendo os animais manifestado quaisquer sinais de sofrimento.

Todos os animais foram mantidos em jejum nas 12 horas que antecederam o procedimento. Como medicação pré-anestésica foram administrados a cada animal, por via intramuscular, 2 mg/kg de azaperona (*Stresnil*), 1 mg de atropina e, após um período de 15 minutos, 20 mg/kg de cloridrato de quetamina (*Imalgene 1000*). Já na sala de hemodinâmica foi colocado um cateter venoso de 22 G (*Abbocath*) na veia marginal da orelha, através do qual se administraram 6 mg/kg de tiopental sódico 5% (*Tiopental BRAUN*). Depois da confirmação da perda do reflexo de deglutição, procedeu-se à intubação orotraqueal, após o que o animal foi colocado em ventilação controlada com volume corrente de 10 ml kg<sup>-1</sup>. Para a manutenção da anestesia utilizou-se isoflurano a 2% (*Isoflo*, Abbott Laboratories) em fluxo constante de O<sub>2</sub>. Os animais foram mantidos em infusão venosa contínua de solução salina 9% até ao final da intervenção e a sua temperatura assegurada com manta térmica.

Durante procedimento manteve-se a monitorização hemodinâmica e eletrocardiográfica dos animais, tendo também sido realizados eletrocardiogramas de 12-derivações no início e no final. Após a colocação dos introdutores (6 F) na artéria e veia femoral direitas, foram administradas 200 U kg<sup>-1</sup> de heparina (*Heparin Braun*). A pressão arterial na aorta e a pressão telediastólica foram determinadas com a utilização de um cateter *pigtail* (*Cordis*). Durante o procedimento manteve-se a monitorização hemodinâmica e eletrocardiográfica dos animais. A cateterização seletiva da coronária esquerda foi realizada com um cateter guia *Amplatz* esquerdo 0,75, 6 F (*Cordis*), seguida de uma angiografia de base com injeção prévia de 0,5-1 mg de dinitrato de isossorbido intracoronário (*Isoket*, Schwarz Pharma Ac.).

Um fio guia 0,014 *PressureWire*™ *Certus* (*St. Jude Medical*) foi posicionado com o sensor na união do terço médio com o distal da descendente anterior, após a equalização das pressões com o sensor na coronária imediatamente a seguir à extremidade do cateter. Sempre que a navegação deste guia na descendente anterior se revelou difícil esta foi

feita com um guia *BMW* (*Abbott Vascular*) e os guias trocados com o auxílio de um microcateter *FineCross*™ (*Terumo Interventional Systems*).

Foi utilizada uma consola *RadiAnalyzer*™ *Xpress* (*St. Jude Medical*) e o respetivo *software* para a determinação da *Pd* e do *Tmn* na descendente anterior. Para avaliação do *Tmn* foram feitas séries de injeções intracoronárias de 3 ml de soro fisiológico à temperatura ambiente, através do cateter guia. A média dos três valores mais próximos e com curvas temperatura/tempo semelhantes forneceu o *Tmn*. O valor de IRM é o quociente da divisão da *Pd* coronária pelo inverso do *Tmn*. Embora o IRM seja aquele que é avaliado em condições de hiperémia máxima, para efeito dos resultados apresentados neste estudo, e tendo em conta o seu objetivo, consideraram-se todas as determinações como IRM e o avaliado em hiperémia máxima como o verdadeiro IRM.

Após a avaliação da *Pd* e do *Tmn* em condições basais, mantendo sempre o fio guia na mesma posição, foi determinado o IRM com hiperémia máxima induzida pela injeção intracoronária de 5 mg de papaverina, depois da confirmação da descida da pressão distal durante o primeiro minuto e sucessivamente aos dois, cinco, oito e dez minutos. A seguir a um intervalo de dez minutos (que permitiu a metabolização da papaverina anteriormente administrada), foi feita a injeção intracoronária de 10 mg papaverina e a mesma sequência de avaliações foi realizada.

Para comprometer a microcirculação coronária foram injetados 0,25 ml de solução de microesferas de 40 µm de diâmetro diluídas em contraste (aproximadamente  $30 \times 10^6$  microesferas), *Embozene*® *Microspheres* (*CelaNova BioSciences*), através de um microcateter com a ponta colocada na descendente anterior, distal à primeira diagonal e proximal ao microsensor do fio de pressões, o qual foi mantido na mesma posição. Após cinco minutos avaliou-se o IRM com hiperémia máxima induzida pela injeção intracoronária de 10 mg de papaverina durante o primeiro minuto e depois de confirmação da descida da pressão distal.

O pressuposto da normalidade foi validado com o teste Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors, usando o teste de Shapiro-Wilk apropriado para amostras reduzidas. As variáveis categóricas são apresentadas como contagem e percentagem do total. As variáveis contínuas são expressas como média e desvio-padrão. Para avaliar as diferenças entre as avaliações em condições basais e após os 5 e os 10 mg de papaverina, assim como após a injeção de microesferas, recorreu-se ao teste *t-student* para amostras emparelhadas. A análise estatística foi realizada com o programa SPSS 20.

## Resultados

Os parâmetros hemodinâmicos de base foram: frequência cardíaca de  $92 \pm 10$  bmp, pressão arterial média de  $48 \pm 5$  mmHg e pressão telediastólica do ventrículo esquerdo de  $6 \pm 1,4$  mmHg. Todos os animais mantiveram estabilidade hemodinâmica e eletrocardiográfica após as injeções de papaverina. Após o compromisso de microcirculação houve elevação do segmento ST em V1-V3 em todos os animais, não havendo disritmias ventriculares ou instabilidade hemodinâmica na população estudada.

Em cada animal foram realizadas 14 determinações de IRM, num total de 112 na amostra avaliada. A variação do



**Tabela 1** Resposta da pressão distal média (Pd) à injeção intracoronária de duas doses (5 e 10 mg) de papaverina

	Papaverina 5 mg	Papaverina 10 mg	p
Pd (mmHg)	39 ± 9	40 ± 7	0,7
Diferença Pd base (mmHg)	11,4 ± 5	10,6 ± 5	0,7
Variação Pd base (%)	22 ± 10	21 ± 8	0,5

tempo de trânsito das três medições consideradas para o cálculo do IRM em cada avaliação em hiperemia máxima foi de 10%. A Pd média de base foi de  $51 \pm 9$  mmHg. Na Tabela 1 estão apresentados os valores de Pd, que refletem a hiperemia máxima após a injeção de papaverina, não havendo diferenças entre as duas doses. Os valores de IRM para cada animal estão apresentados na Tabela 2. A média do verdadeiro IRM foi de  $11 \pm 4,5$  U com 5 mg de papaverina e de  $10,6 \pm 3$  U com a dose de 10 mg ( $p = 0,612$ ).

Com ambas as doses de papaverina o IRM verdadeiro foi observado ao primeiro minuto em cinco animais, logo após o primeiro minuto em dois e logo após os dois minutos em um animal. A evolução temporal dos valores de IRM foi semelhante com as duas doses (Figura 1), tendo o IRM deixado de ter diferenças em relação ao valor de base aos cinco minutos ( $p = 1$  para os 5 mg e  $p = 0,98$  para os 10 mg).

Com o compromisso da microcirculação após a injeção das microesferas houve uma elevação significativa do verdadeiro IRM em todos os animais para um valor médio de  $41,3 \pm 16$  U (Figura 2;  $p=0,002$  com 5 mg de papaverina;  $p=0,001$  com 10 mg de papaverina). Com a dose de 10 mg de papaverina a elevação média do IRM verdadeiro foi de  $310 \pm 190\%$ .

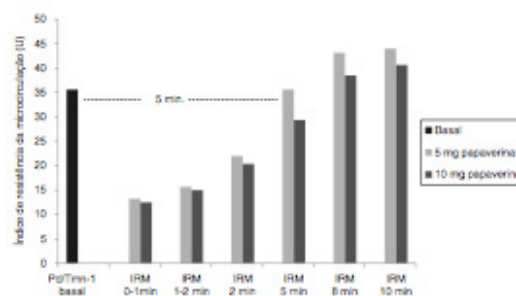
## Discussão

São vários os motivos que tornam o estudo da microcirculação cardíaca cada vez mais pertinente.

**Tabela 2** Valores observados por animal do quociente da pressão distal média pelo inverso do tempo médio de trânsito em condições basais, após indução de hiperemia máxima com 5 e 10 mg de papaverina (IRM 5 e 10 mg) e após o compromisso da microcirculação com microesferas (IRM pós-microesferas)

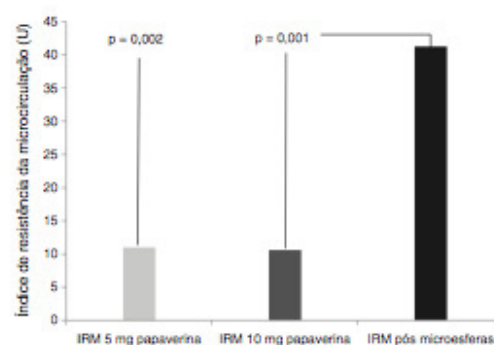
Animais	Pd/Tmn <sup>-1</sup> basal	IRM (U) 5 mg	IRM (U) 10 mg	IRM (U) pós-microesferas
1	23	7	8	35
2	42	7	8	31
3	25	9	9	71
4	28	13	14	52
5	56	11	11	23
6	33	10	9	46
7	30	10	10	46
8	48	21	16	26

IRM: índice da resistência da microcirculação; Pd: pressão distal média; Tmn: tempo médio de trânsito.

**Figura 1** Evolução temporal do IRM após injeção intracoronária de papaverina e comparação com Pd/Tmn<sup>-1</sup> de base. IRM: índice da resistência da microcirculação. Pd: pressão distal média. Tmn: tempo médio de trânsito.

É nos pequenos vasos que se encontram importantes limitações à terapêutica de revascularização percutânea, bem representadas no *no-reflow* coronário ou na manutenção de isquemia miocárdica após intervenção nos vasos epicárdicos, sobretudo no contexto de enfarte agudo do miocárdio<sup>11</sup>. É também na microcirculação que residem os processos fisiopatológicos de várias doenças cardíacas, desde a síndrome X<sup>12</sup> à mal definida cardiomiopatia de stress ou síndrome de Takotsubo<sup>13</sup>. Por outro lado, existem novas estratégias terapêuticas em estudo para o tratamento das doenças cardíacas, como a terapia gênica ou a terapia celular, que têm efeitos nos pequenos vasos por estimularem a angiogênese ou por utilizarem a via intracoronária para administração de células<sup>14,15</sup>.

O estabelecimento de um modelo pré-clínico para o estudo da microcirculação é importante neste contexto, permitindo avaliar o efeito ou as limitações das terapêuticas atuais ou futuras. A vascularização cardíaca do porco é a que se aproxima mais da humana, apresentando uma anatomia coronária com morfologia e dimensões semelhantes, mesmo quanto ao diâmetro dos capilares<sup>16</sup>. Sendo um animal de utilização doméstica, acessível e de fácil manejo, o

**Figura 2** IRM após compromisso de microcirculação coronária com microesferas em comparação com o valor inicial determinado com 5 e 10 mg de papaverina. IRM: índice da resistência da microcirculação.



porco tornou-se no modelo animal de eleição para os estudos pré-clínicos da microcirculação cardíaca.

O estudo da resistência da microcirculação é realizado durante uma fase de dilatação máxima da árvore coronária, conseguida farmacologicamente através da administração de vasodilatadores da microcirculação e reflete a capacidade máxima existente para aumentar o fluxo coronário recrutando toda a rede circulatória disponível. Embora a adenosina seja o fármaco mais divulgado na prática clínica pela sua segurança, os estudos pré-clínicos têm privilegiado a papaverina intracoronária. A papaverina é mais eficaz do que a adenosina<sup>17</sup>, sendo que esta última pode ter também limitações na sua capacidade vasodilatadora em animais de grande porte<sup>18</sup>.

A dose de papaverina utilizada nos estudos tem variado entre os 5 mg e os 20 mg (sendo esta a dose habitualmente usada no ser humano), não estando ainda definida qual a melhor dose ou se existem diferenças com significado na determinação do IRM. No nosso trabalho a dose menor de 5 mg teve um efeito semelhante à dose superior de 10 mg, quanto à descida da pressão distal e ao valor de IRM avaliado. Por outro lado, a dose superior mostrou-se igualmente segura, não se associando a instabilidade hemodinâmica ou elétrica. Como a correta determinação do IRM depende da indução de hiperémia máxima, ou seja, da administração intracoronária da quantidade suficiente de fármaco, e podendo esta ser influenciada pela seletividade ou estabilidade do próprio cateter, será razoável supor que a dose de 10 mg pode ser a que garante uma melhor uniformidade dos resultados e aquela a utilizar sistematicamente.

O IRM foi validado num modelo suíno por Fearon et al.<sup>6</sup>. Utilizando nove animais observaram um IRM médio de  $16,9 \pm 6,5$  U após indução de hiperémia com injeção intracoronária de 20 mg de papaverina. Este valor é ligeiramente mais elevado do obtido na nossa população o que poderá estar relacionado com a manipulação cirúrgica da descendente anterior a que os animais foram sujeitos nesse estudo. Estes valores são inferiores aos 21 U descritos em humanos sem doença coronária e esta diferença deverá fazer parte da extrapolação para o homem dos resultados dos estudos com modelo suíno<sup>16</sup>. Outro aspeto a ter em conta é a importância da correção do IRM com a pressão de encravamento coronário no contexto de doença da macrocirculação e da existência de circulação colateral<sup>19</sup>, o que não acontecia com o nosso modelo animal.

Apesar das vantagens do IRM, a sua determinação depende de uma metodologia consistente, que cuide da correta calibração e posicionamento do guia de pressões, da indução eficaz da hiperémia máxima, da injeção intracoronária do soro fisiológico à temperatura ambiente e da interpretação das curvas tempo/temperatura durante a fase de fluxo máximo. A curta existência do IRM e a sua utilização por um número ainda limitado de investigadores leva que nem todos estes aspetos metodológicos estejam esclarecidos ou definidos.

A avaliação da evolução temporal das variáveis hemodinâmicas após a injeção da papaverina tem implicações práticas importantes. O IRM poderá ser útil no estudo do efeito imediato na microcirculação de várias terapêuticas, sendo relevante saber quando é que ocorre o regresso às condições hemodinâmicas basais. No nosso estudo o IRM deixou de ter diferenças significativas aos cinco minutos após

a injeção de papaverina, em ambas as doses. Desta forma, é aconselhável que qualquer intervenção planeada para ser realizada em condições basais seja realizada depois deste intervalo de tempo. Os nossos resultados apontam também para uma variabilidade interindividual do tempo em que ocorre a hiperémia máxima, com a maioria dos animais, mas não todos, a apresentar esta resposta no primeiro minuto. É necessário ter presente esta variabilidade e efetuar várias séries de medições do tempo de trânsito até ocorrer um nadir, o qual corresponderá ao verdadeiro IRM, caso contrário este poderá ser sobrevalorizado.

Os capilares coronários têm um diâmetro médio de 10  $\mu$ m. A injeção intracoronária de microesferas com 40  $\mu$ m compromete previsivelmente a microcirculação ao obstruir a circulação a jusante das pequenas arteríolas. No nosso estudo utilizou-se a quantidade de microesferas que permite manter o fluxo coronário, evitando o fenómeno de *no reflow*, o que na nossa experiência ocorre com doses superiores. A consistente e significativa elevação observada do IRM após a obstrução da microcirculação, estando o fluxo do vaso epicárdico livre de compromisso, demonstra bem a capacidade deste método e o valor do IRM na avaliação do estado da microcirculação coronária.

A determinação do IRM baseia-se numa metodologia complexa, o que obriga ao refinamento prévio da técnica. Para manter uma baixa variação das suas determinações existem alguns aspetos importantes a ter em consideração. Além do óbvio, como a seletividade da cateterização coronária, a cuidada equalização das pressões, a constância da velocidade das injeções de soro fisiológico, o correto posicionamento do fio de pressões, o cuidado na indução e na escolha do momento de hiperémia máxima, encontramos na nossa experiência fatores ainda não descritos que influenciam ou inviabilizam a determinação do IRM. Os vasos epicárdicos do porco (com o peso habitualmente utilizado em investigação), são de menor calibre, dificultando a navegação com o fio de pressões, sendo frequente dobrar a sua ponta *floppy*. As determinações efetuadas com a ponta do fio dobrada resultam em valores de IRM incorretos e anormalmente elevados. Outras vezes, apesar do fio estar direito, a sua ponta está presa ou encostada a um pequeno vaso, levando o fio a fazer uma dobra durante a sístole, o que se traduz numa maior variabilidade das curvas tempo/temperatura obtidas com a injeção intracoronária de soro, comprometendo a determinação correta do IRM. É pois fundamental manter o fio de pressões direito e livre dentro da coronária, sendo que, para tal, o nosso grupo passou a utilizar um microcateter previamente introduzido na descendente anterior com um fio *standart* (p. ex. BMW) como a forma mais rápida e eficaz de colocar o guia de pressões sem ter uma curva excessiva na sua ponta. A descrição e publicação de todos os pormenores ou soluções que possam contribuir para uma melhoria da técnica é essencial para o seu refinamento e deve ser encorajada nos trabalhos que utilizem o IRM.

## Conclusão

No modelo animal suíno a determinação do IRM permite a avaliação do estado da microcirculação coronária, associando-se a sua obstrução a uma significativa elevação



dos seus valores. Para a necessária indução de hiperemia máxima a dose de 5 mg de papaverina é tão eficaz como a de 10 mg. Existe variabilidade interindividual quanto ao tempo em que ocorre a hiperemia máxima, sendo que o retorno a condições hemodinâmicas semelhantes às basais ocorre após cinco minutos da injeção de papaverina.

### Responsabilidades éticas

**Proteção dos seres humanos e animais.** Os autores declaram que os procedimentos seguidos estavam de acordo com os regulamentos estabelecidos pelos responsáveis da Comissão de Investigação Clínica e Ética e de acordo com os da Associação Médica Mundial e da Declaração de Helsinki.

**Confidencialidade dos dados.** Os autores declaram que não aparecem dados de pacientes neste artigo.

**Direito à privacidade e consentimento escrito.** Os autores declaram que não aparecem dados de pacientes neste artigo.

### Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

### Bibliografia

- Kern MJ, Lerman A, Bech J-W, et al. Physiological assessment of coronary artery disease in the cardiac catheterization laboratory: a scientific statement from the American Heart Association Committee on Diagnostic and Interventional Cardiac Catheterization, Council on Clinical Cardiology. *Circulation*. 2006;114:1321-41.
- Pijls NHJ. Coronary thermodilution to assess flow reserve: validation in humans. *Circulation*. 2002;105:2482-6.
- Banerjee SRK, Ashtekar KD, Effat MA, et al. Concurrent assessment of epicardial coronary artery stenosis and microvascular dysfunction using diagnostic endpoints derived from fundamental fluid dynamics principles. *J Invasive Cardiol*. 2009;21:511-7.
- de Bruyne WWB, Bartunek J, Sys SU, et al. Simultaneous coronary pressure and flow velocity measurements in humans. Feasibility, reproducibility, and hemodynamic dependence of coronary flow velocity reserve, hyperemic flow versus pressure slope index, and fractional flow reserve. *Circulation*. 1996;15:1842-9.
- Kern MJ. Coronary physiology revisited: practical insights from the cardiac catheterization laboratory. *Circulation*. 2000;101:1344-51.
- Fearon WF, Balsam LB, Farouq HMO, et al. Novel index for invasively assessing the coronary microcirculation. *Circulation*. 2003;107:3129-32.
- Ng MKC, Yeung AC, Fearon WF. Invasive assessment of the coronary microcirculation: superior reproducibility and less hemodynamic dependence of index of microcirculatory resistance compared with coronary flow reserve. *Circulation*. 2006;113:2054-61.
- Gandolfi F, Vanelli G, Pennarossa, et al. Large animal models for cardiac stem cell therapies. *Therigenology*. 2011;75:1416-25.
- Suzuki Y, Yeung AC, Ikeno F. The representative porcine model for human cardiovascular disease. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:1954-83.
- de Bruyne B, Barbato E, Pijls NHJ, et al. Intracoronary and intravenous adenosine 5'-triphosphate, adenosine, papaverine, and contrast medium to assess fractional flow reserve in humans. *Circulation*. 2003;107:1877-83.
- Niccoli CFG, Burzotta F, Galluto L. Myocardial no-reflow in humans. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:281-92.
- Jones MNE, Eteiba W. Cardiac syndrome X and microvascular coronary dysfunction. *Trends Cardiovasc Med*. 2012;22:161-8.
- Layland WAJ, Whitbourn R, Macisaac A, et al. Takotsubo cardiomyopathy: reversible elevation in microcirculatory resistance. *Cardiovasc Revasc Med*. 2012;3:66-8.
- Gupta R, Tongers J, Losordo DW. Human studies of angiogenic gene therapy. *Circulation research*. 2009;105:724-36.
- Erbs S, Linke A, Schächinger V, et al. Restoration of microvascular function in the infarct-related artery by intracoronary transplantation of bone marrow progenitor cells in patients with acute myocardial infarction: the Doppler Substudy of the Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infa. *Circulation*. 2007;116:366-74.
- Kassab GS, Fung YC. Topology and dimensions of pig coronary capillary network. *Am J Physiol*. 1994;267:H319-25.
- Wilson RF, Wyche K, Christensen BV, et al. Effects of adenosine on human coronary arterial circulation. *Circulation*. 1990;82:1595-606.
- Jeremias a, Filardo SD, Whitbourn RJ, et al. Effects of intravenous and intracoronary adenosine 5'-triphosphate as compared with adenosine on coronary flow and pressure dynamics. *Circulation*. 2000;101:318-23.
- Aamoudse W, Fearon WF, Manoharan G, et al. Epicardial stenosis severity does not affect minimal microcirculatory resistance. *Circulation*. 2004;110:2137-42.



## Artigo aceite para publicação na PLoS ONE

### TITLE PAGE

Intracoronary delivery of human mesenchymal/stromal stem cells: insights from coronary microcirculation invasive assessment in a swine model

António Fiarresga<sup>1,2</sup>, Márcia F. Mata<sup>3</sup>, Sandra Cavaco-Gonçalves<sup>4</sup>, Mafalda Selas<sup>1</sup>, Irina N. Simões<sup>3</sup>, Eunice Oliveira<sup>1</sup>, Belmira Carrapiço<sup>5</sup>, Nuno Cardim<sup>2</sup>, Joaquim M.S. Cabral<sup>3</sup>, Rui Cruz Ferreira<sup>1</sup>, Cláudia Lobato da Silva<sup>3</sup>

1. Cardiology Department, Hospital de Santa Marta, Lisboa, Portugal
2. Nova Medical School, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal
3. Department of Bioengineering and iBB-Institute for Bioengineering and Biosciences, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal
4. National Institute for Agrarian and Veterinary Research, Oeiras, Portugal
5. Faculty of Veterinary Medicine, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

### Short Title

Intracoronary delivery of human mesenchymal/stromal stem cells

Corresponding author

António Fiarresga

\* Hospital de Santa Marta, Rua de Santa Marta, n°49, 1150-1024, Lisboa, Portugal

Tel- +351 966 655 613

Fax - +351 217 784 241

email - [a.fiarresga@gmail.com](mailto:a.fiarresga@gmail.com)

### **Abstract**

**Background:** Mesenchymal stem/stromal cells have unique properties favorable to their use in clinical practice and have been studied for cardiac repair. However, these cells are larger than coronary microvessels and there is controversy about the risk of embolization and microinfarctions, which could jeopardize the safety and efficacy of intracoronary route for their delivery. The index of microcirculatory resistance (IMR) is an invasive method for quantitatively assessing the coronary microcirculation status.

**Objectives:** to examine heart microcirculation after intracoronary injection of mesenchymal stem/stromal cells with the index of microcirculatory resistance.

**Methods:** Healthy swine were randomized to receive by intracoronary route either  $30 \times 10^6$  MSC or the same solution with no cells (1% human albumin/PBS) (placebo). Blinded operators took coronary pressure and flow measurements, prior to intracoronary infusion and at 5 and 30 minutes post-delivery. Coronary flow reserve (CFR) and the IMR were compared between groups.

**Results:** CFR and IMR were done with a variance within the 3 transit time measurements of 6 % at rest and 11 % at maximal hyperemia. After intracoronary infusion there were no significant differences in CFR. The IMR was significantly higher in MSC-injected animals (at 30 minutes, 14.2U vs. 8.8U,  $p=0.02$ ) and intragroup analysis showed a significant increase of 112% from baseline to 30 minutes after cell infusion, although no electrocardiographic changes or clinical deterioration were noted.

**Conclusion:** Overall, this study provides definitive evidence of microcirculatory disruption upon intracoronary administration of mesenchymal stem/stromal cells, in a large animal model closely resembling human cardiac physiology, function and anatomy.

### Keywords

Cell therapy, mesenchymal stem/stromal cells, intracoronary delivery, coronary microcirculation, index of microcirculatory resistance.

### Introduction

Cardiovascular diseases represent the leading cause of death in developed countries despite major advances in its treatment and prevention, and these are also a major cause of disability, lost productivity and increased health costs worldwide [1]. Most cardiovascular diseases are associated with loss of functional cardiomyocytes, which are not replaced due to the limited regenerative capacity intrinsic to the heart. In recent years, cell-based therapy has been presented as a potential therapeutic strategy for cardiac regeneration [2].

Mesenchymal stem/stromal cells (MSC), in particular, have emerged as a promising candidate for cell-based therapies [3]. These cells have important intrinsic features for therapeutic settings namely: easy isolation from a small aspirate of bone marrow, adipose tissue or from other sources of perinatal origin (*e.g.* umbilical cord) and high *in vitro* expansion potential [4,5], multilineage differentiation capacity [6], ability to modulate immune responses and secrete various cytokines that play a role in processes such as angiogenesis, inflammation, cellular migration and apoptosis [7]. Although there is no clear evidence that MSC can differentiate into myocardial cells [8], the advantages of a MSC-based therapy could lie in the immunomodulatory effects mediated by these cells, as well as the ability of MSC to promote growth, survival or differentiation of other cells in the damaged myocardial area through paracrine mechanisms [9]. These properties have encouraged pre-clinical and clinical research to explore the potential role of MSC as a cell-based treatment for heart disease [3].

The use of intracoronary (IC) artery infusion in cell-based therapy is based on standard knowledge and catheterization techniques allowing direct delivery of a large number of cells into myocardial regions. With this advantage, the IC route has been the most used delivery method of hematopoietic cells (*i.e.* mononucleated cells, MNC), including stem/progenitor

cells, in cardiovascular cell-based research [2]. However, its use for administration of MSC is still a matter for debate. With a diameter of 10-20  $\mu\text{m}$ , MSC are larger than heart capillaries (5-10  $\mu\text{m}$ ) and there is the risk of microcirculation obstruction [10]. The potential safety issues of intracoronary MSC-based therapies, namely microinfarctions, should be addressed with solid pre-clinical research, as current data is limited and controversial.

Coronary flow reserve (CFR) is the maximum increase in blood flow through the coronary arteries above the normal resting volume and is measured to assess the flow in the epicardial artery and in the microcirculatory bed. The index of microcirculation resistance (IMR), allows a quantitative, invasive, and real-time evaluation of the coronary microcirculation status independently of the epicardial vessel. IMR is defined as distal coronary pressure multiplied by the hyperemic mean transit time ( $\text{mm Hg} \cdot \text{seconds}$ , or units [U]) [11]. Current interventional cardiology techniques allow for the simultaneous measurement of CFR and IMR with a pressure-temperature sensor-tipped wire. Mean transit time is derived from thermodilution after IC injection of room-temperature saline and it correlates to the coronary absolute flow. Disruption of the microvascular bed is associated with a significant increase in IMR and this can be determined immediately after an IC intervention using the same catheter based procedure. IMR assessment is expected to clarify how MSC IC infusion affects heart microcirculation.

## **Objectives**

The overall goal of the present work was to study the IC artery delivery of human MSC in a large animal model - swine - closely resembling coronary circulation and arterial anatomy in humans. Specifically, this study was designed to examine heart microcirculation damage with IMR assessment after MSC IC injection in the animals compared to a control group (*i.e.* no cells administered). We also evaluated the differences in hemodynamic, electrocardiographic and coronary epicardial artery flow parameters upon administration of MSC.

### **Materials And Methods**

#### **Overview**

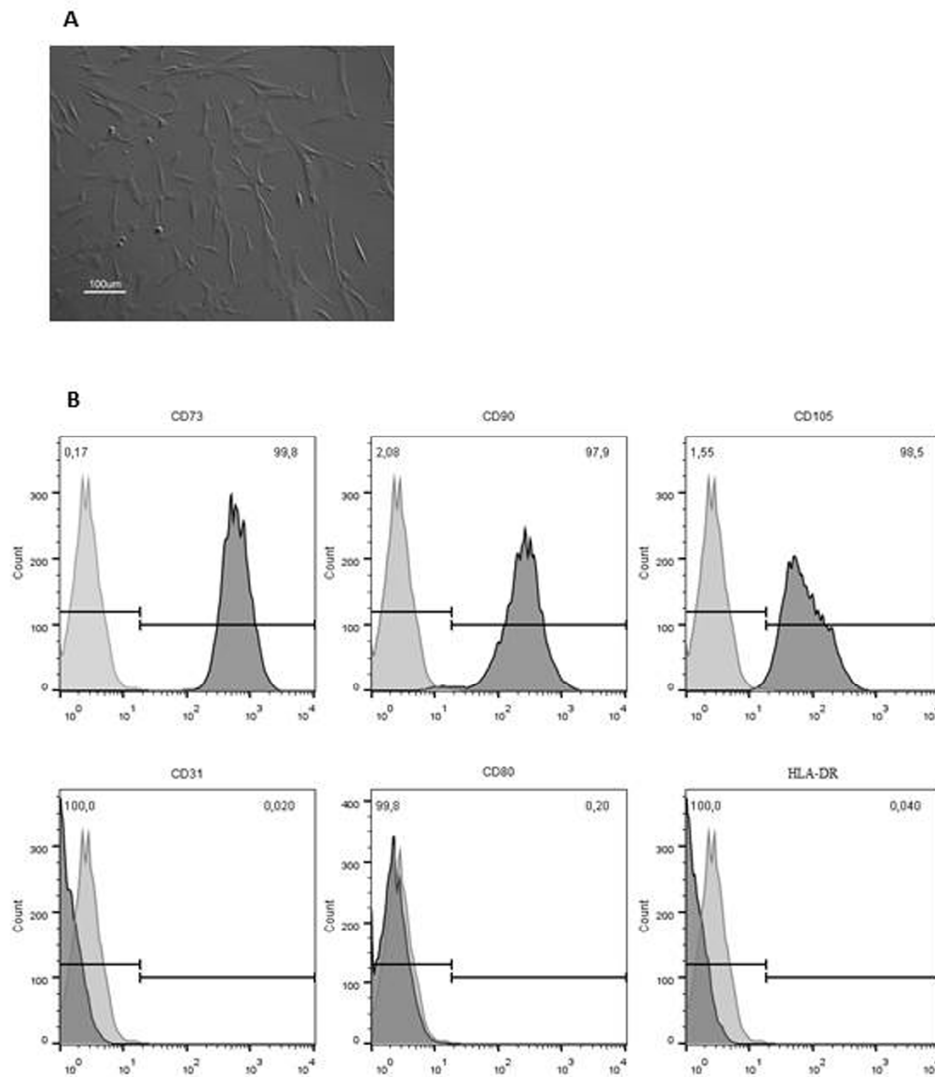
Eighteen swine (males Duroc and females F1 Large White X Landrace) with a weight of 25 to 40 Kg ( $31 \pm 5$  Kg) were randomized to receive either (i) 1 million MSC/kg corresponding to approximately  $30 \times 10^6$  MSC resuspended in phosphate buffered saline (PBS) supplemented with human albumin (HA), or (ii) cell-free PBS/HA solution (placebo – control group). All procedures were the same between the two groups. The operators performing all measurements were blinded to which group the animal belonged to.

#### **MSC preparation**

MSC used in this study were part of the cell bank available at the Stem Cell Bioengineering and Regenerative Medicine Laboratory, Instituto Superior Técnico (IST-iBB). These cells were isolated from Bone marrow (BM) aspirates from healthy donors upon informed consent according to the protocol described by dos Santos and co-workers [12]. Briefly, the mononuclear fraction was separated using a Ficoll gradient and cells were isolated based on their ability to adhere to tissue culture plastic (polystyrene) upon cultivation in low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco) supplemented (10%) with MSC-qualified fetal bovine serum (FBS) (Hyclone). For cell preparation in the present study, multiple vials of BM MSC from a single donor (kept cryopreserved in a liquid/vapour phase nitrogen tank) were thawed and plated at 3000-6000 cells/cm<sup>2</sup> on T-175 flasks (BD Falcon) using DMEM-10%FBS and expanded upon consecutive passaging to reach the target cell doses for administration. Cells at passages P5-P7 were used in the present study. Cell number and viability were assessed using the Trypan Blue exclusion method (Gibco) and counting cells on a hemocytometer under an optical microscope (Olympus).

MSC were characterized by flow cytometry using specific monoclonal antibodies according to criteria defined in the literature [13]. Over 95% of the population should express CD73, CD90 and CD105 and not express (less than 2%) CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD80 and HLA-DR. For this purpose, cells were incubated for 15 minutes in the dark with a panel

of mouse anti-human fluorescent-labeled monoclonal antibodies (all from BioLegend, except anti-CD105 (Invitrogen)). Cells were then washed with PBS and analyzed by flow cytometry. A minimum of 10 000 events were collected for each sample and the CellQuest<sup>TM</sup> software (Becton Dickinson) was used for acquisition and analysis. The differentiation potential of MSC was tested using biochemical methods after *in vitro* induction of osteogenesis, adipogenesis, and chondrogenesis using specific culture media.



In order to prepare administration, expanded cells were resuspended in a HA-containing (1%) solution prepared by dilution (1:30) of a stock solution (30%, Alburnorm, Octapharma) in PBS. Multiple samples of cell suspensions were observed under optical microscopy at different time points upon resuspension to verify the occurrence of cell aggregation. Cells were transported from the cell culture laboratory at IST-iBB to animal facilities at room temperature and administered within 2 hours.

### **Animal care and catheterization procedures**

Animal procedures were approved by the Ethical and Animal Welfare commission of the Veterinary Medical School, Universidade de Lisboa, and the study was authorized by the national regulatory authorities. All handling and care followed the European directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

Animals fasted overnight prior to the experiments. Anesthesia was induced by intramuscular injection of azaperone (2 mg/kg), atropine (1 mg) and after 15 minutes, ketamine (20 mg/kg). In the catheterization laboratory, a venous catheter (22 G) was placed in the marginal ear vein, through which sodium thiopental (6 mg/kg) was injected. Anesthesia was maintained with mechanical tracheal ventilation (tidal volume of 10 ml/kg) and inhaled isoflurane (2%). After placing a 6F sheath in the femoral artery, anticoagulation was achieved with intravenous heparin (300 U/ kg). Hemodynamic and electrocardiographic monitoring was maintained during the entire experiment. Aorta and left ventricle pressure measurements were done with a 6F pigtail catheter and for selective catheterization of the left main artery a 6F Amplatz left 0.75 was used. All heart catheterization procedures were conducted under fluoroscopy.

At the end of the experiment, animals that received MSC were euthanized with intravenous sodium thiopental. Control animals were treated with intravenous carprofen (2 mg/kg) plus amoxicillin (15mg/kg) and kept in 48 hours quarantine with no signs of suffering.

### **MSC delivery**

After selective catheterization of the left main artery, a microcatheter FineCross™ (Terumo Interventional Systems) was placed in the left anterior descending coronary artery (LAD), just distal to the first diagonal branch and with the help of a .014 guiding wire BMW® (Abbott Vascular). Through its central lumen, the 20 cc solution was injected at a 4 cc / min constant flow, using an oscillating infusion pump syringe to prevent cell aggregation. At the end, the microcatheter was removed and a coronariography was performed to exclude dissections.

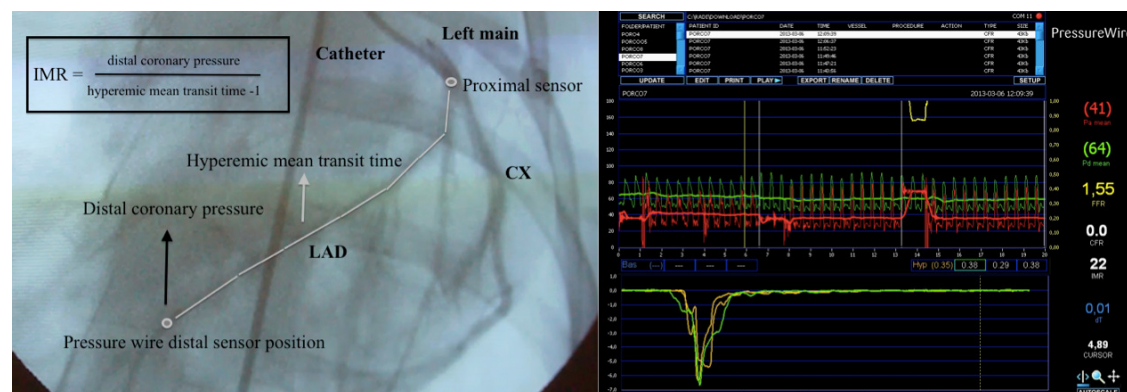


### Coronary pressure and flow measurements

Measurements were taken prior to IC infusion and at 5 and 30 minutes post-delivery. A coronary pressure wire, PressureWire™ Certus (St. Jude Medical), was calibrated and advanced to the distal LAD, with the sensor located in the middle third of the coronary. The position of the wire was maintained during the experiment.

A RadiAnalyzer™ Xpress interface and software (Radi Medical Systems, St. Jude Medical) were used for pressure and mean transit time records. Thermodilution-derived mean transit time was assessed after a rapid injection of 3 ml of room temperature saline (*i.e.* PBS/HA) through the guiding catheter. Measurements were taken at resting and after maximal hyperemia induced with 10 mg IC papaverine. Three measurements were considered and the mean values were used for analysis. Distal coronary pressure was simultaneously recorded.

CFR was defined as resting mean transit time divided by hyperemic mean transit time. IMR was calculated distal coronary pressure multiplied by the hyperemic mean transit time (mm Hg · seconds, or units [U]) (Fig. 1).



**Fig. 1 - Left coronary angiography and RadiAnalyzer™ Xpress interface display.** The mean transit time was estimated after a rapid IC injection of room temperature saline through the guiding catheter. Temperature change is first detected at the proximal sensor, and then saline circulates in coronary artery and reaches the distal sensor. The distal sensor of the pressure wire also assesses the distal pressure. IMR is calculated with these two variables.

Thermodilution curves could be seen at the bottom of the interface display (green and yellow). In the middle, aortic pressure (red curve) and distal coronary pressure (green curve) are also shown. LAD: left anterior descendent artery; CX: circumflex artery, IMR: index of microcirculatory resistance.

### **Electrocardiographic, hemodynamic, and angiographic evaluation**

Twelve-lead electrocardiograms (ECG) were done before heart catheterization and 30 minutes after IC delivery of MSC or cell-free solution. Electrocardiographic monitoring was maintained through the experiment. Heart rate, ventricular arrhythmias and ECG profile changes with evidence of acute myocardial ischemia were assessed.

Intraventricular and aortic pressures were recorded at the beginning of the experiment and 30 minutes after IC infusion.

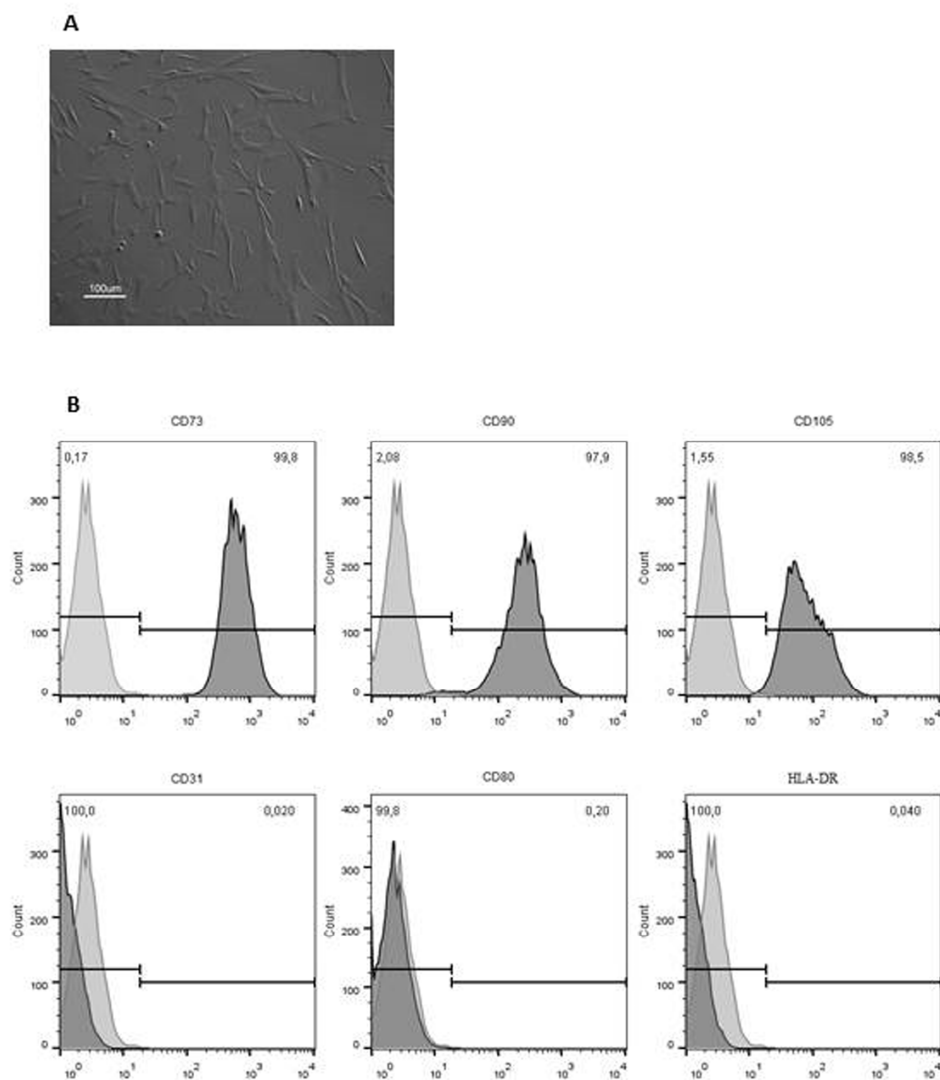
After selective catheterization of the left main artery, 0.5 mg of isosorbide dinitrate was injected for coronary dilation. Left coronary angiograms were done with manual injection of 10 cc of iodine-based contrast media prior to IC infusion, immediately after and at 30 minutes. Coronary epicardial flow was classified with the TIMI scoring system.

### **Statistical analysis**

Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation. Normality was assessed using the Shapiro–Wilk’s tests. Comparisons were made among control and MSC animal groups using Student’s *t*-test for independent variables, significance was set at the 0.05 level. Intragroup analysis was done using repeated measures ANOVA model with post hoc paired *t*-tests with Bonferroni’s correction, a corrected *p* value  $< 0.05$  was taken as significant. Statistical. Analysis was performed using site-licensed SPSS® statistical software.

## Results

For the purpose of this study, BM-derived MSC administered into the animals were previously expanded onto tissue culture flasks through consecutive passaging and maintained their characteristic spindle shape morphology (Fig. 2A), immunophenotype (Fig. 2B), as well as their multilineage differentiation ability (data not shown).



**Fig. 2 - Characterization of bone marrow (BM)-derived mesenchymal stem/stromal cells (MSC) expanded on tissue culture flasks using DMEM culture medium supplemented with 10% FBS.**

(A) Morphology of cultured cells assessed by optical microscopy. (B) Immunophenotype of cultured MSC assessed by flow cytometry according to Materials and Methods description. Percentage (%) displayed in the upper right corner of each histogram indicates the expression of each antigen.

Hemodynamic parameters are presented in Table 1. There were no significant differences in baseline parameters between MSC and control groups. After MSC injection there were no significant changes in heart rate, left ventricular end-diastolic pressure and systolic aortic pressure. There was no significant coronary artery narrowing and all animals had TIMI 3 grade distal blood flow immediately after and at 30 minutes of IC infusion. During the procedure no ST-segment elevation or ventricular arrhythmias were observed.

	CONTROL	MSC	P
Weight (kg)	31 ± 2	32 ± 2	0.8
Heart rate (bpm)	106 ± 5	100 ± 5	0.5
Aortic systolic pressure (mmHg)	98 ± 7	93 ± 3	0.4
End-diastolic LV <sup>1</sup> pressure (mmHg)	7.7 ± 2	7.3 ± 2	0.7
Post-delivery heart rate (bpm)	114 ± 23	111 ± 15	0.7
Post-delivery aortic systolic pressure (mmHg)	96 ± 18	88 ± 13	0.3
Post-delivery end-diastolic LV <sup>1</sup> pressure (mmHg)	8.3 ± 3	8.2 ± 3	0.9

**Table 1 - Weight, baseline and post-delivery hemodynamic parameters in *Control* and *MSC* animals.** Means and standard deviation, differences assessed with Student's *t*-test for independent variables (n=9). <sup>1</sup>Left ventricle.

The variance within the 3 hyperemic transit time measurements was 6% at rest and 11% at maximal hyperemia in the studied population (18 animals divided into two groups, n=9). The mean reduction in distal coronary pressure after IC papaverine was  $18 \pm 7.0$  mmHg in control animals and  $14 \pm 5.0$  in MSC animals ( $p=0.2$ ), a relative decrease of 27% and 22%, respectively.

The mean values of CFR and IMR are presented in Table 2. CFR and IMR were similar between the 2 groups at baseline. After IC infusion there were no significant differences in CFR, although a small decrease was observed in the MSC group. Concerning IMR, no significant differences were observed at 5 minutes, but a significant increase was observed at 30 minutes in the MSC-injected animals ( $p=0.02$ ).

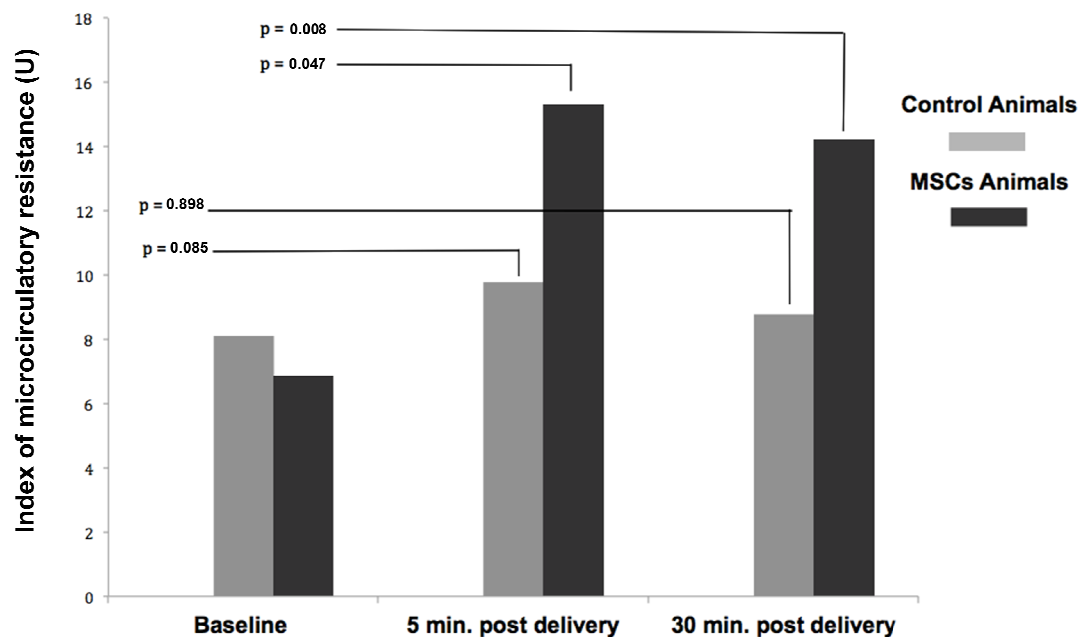
	CONTROL	MSC	P
Baseline CFR <sup>1</sup>	$3.8 \pm 1$	$4 \pm 2$	0.7
Baseline IMR <sup>2</sup> (U)	$8.1 \pm 1$	$6.7 \pm 0.6$	0.3
Post-delivery CFR <sup>1</sup> – 5 min.	$3.6 \pm 1$	$3 \pm 2$	0.5
Post-delivery CFR <sup>1</sup> – 30 min.	$3.8 \pm 2$	$2.3 \pm 1.5$	0.06
Post-delivery IMR <sup>2</sup> – 5 min. (U)	$9.8 \pm 1$	$15.3 \pm 2.8$	0.08
Post-delivery IMR <sup>2</sup> – 30 min. (U)	$8.8 \pm 1$	$14.2 \pm 1.8$	0.02

**Table 2 - Coronary flow reserve and index of microcirculatory resistance in *Control* and *MSC* animals.** Means and standard deviation, differences assessed with Student's *t*-test for independent variables (n=9).

<sup>1</sup> Coronary flow reserve

<sup>2</sup> Index of microcirculatory resistance.

Fig. 3 shows the results of IMR assessed at 5 and 30 minutes after intracoronary infusion. In repeated measures ANOVA mean IMR differed statistically significantly between time points in animals that received cells ( $F(2,16)=8.925$ ,  $p=0.002$ ). In these animals the baseline IMR was  $6.7 \pm 0.6$  U, and after IC infusion increased to  $15.3 \pm 2.8$  U at 5 minutes (corresponding to a 128% increase,  $p=0.047$ ) and to  $14.2 \pm 1.8$  U at 30 minutes (112% increase,  $p=0.008$ ). In the control group there was a barely detectable statistically significant difference in mean IMR ( $F(2,16)=3.897$ ,  $p=0.042$ ), and the Bonferroni post hoc test did not reveal significant difference between time points. The baseline IMR values in control animals was  $8.1 \pm 1.0$  U, and after IC infusion increased to  $9.8 \pm 1.0$  U at 5 minutes (corresponding to a 21% increase,  $p=0.085$ ) and to  $8.8 \pm 1$  U at 30 minutes (9% increase,  $p=0.898$ ).



**Fig. 3 - The index of microcirculatory resistance – results at baseline, 5 and 30 minutes.** Baseline, 5 and 30 minutes post delivery IMR values are shown for Control and MSC group (n=9). Differences from baseline were assessed with repeated measures ANOVA and P-values are adjusted for multiple comparisons (Bonferroni).

## Discussion

After several years of cardiovascular cell-based research, the optimal cell type for regenerating the damaged myocardium and trigger neovascularization and angiogenesis, as well as the best cell delivery route, have not been established yet.

MSC in particular have been extensively investigated in cardiac regenerative therapy trials during the past decade [14,15]. In pre-clinical studies these cells have been shown to engraft in the heart, reduce infarction size and allow for an improvement in ventricle contractile function in rodent [16,17] and larger animal models [18,19].

In the present work, we studied the IC delivery of human BM-derived MSC in a swine model, closely resembling coronary circulation and arterial anatomy in humans. We chose to use culture-expanded, human BM-derived cells defined by the standards of the International Society of Cellular Therapy (ISCT) [13], since these cells, despite representing a heterogeneous cell population, have been widely exploited experimentally and in clinical trials. For instances, Hare and co-workers reported in 2009 a double-blind controlled phase I study demonstrating the safety of the intravenous route of MSC in patients with myocardial infarction [20]. More recently, Bartunek and colleagues, in the C-Cure trial, demonstrated the safety associated with signs of clinical benefit of MSC endomyocardial injections in patients with chronic heart failure [21].

The IC cell delivery of MSC has proven to result in an increased cell engraftment within the infarcted tissue of porcine compared to the intravenous route [22]. The comparison of IC delivery *versus* the endocardial route is more controversial [22,23]. While IC delivery is based on coronary procedures that are part of clinical practice nowadays, the endocardial administration of cells relies on more complex techniques that interventional cardiologists are not familiar with. Nevertheless, despite the advantages of the IC route, there is apprehension about the size of MSC and the possibility of microvascular obstruction [24,25], myocardial microinfarctions [26], and decreased coronary flow [21] upon MSC delivery. In this context,

preclinical data has been controversial but some recent studies support the safety and clinical benefit of MSC IC delivery [27,28].

It has been hypothesized that microcirculatory entrapment of MSC and their consequences to coronary flow are probably dose related. For instance, Hong and colleagues performed an IC dose escalating study in 3 pigs, injecting 1, 3, 10, 30, 100x10<sup>6</sup> of adipose-derived stem cells with 30 minute intervals [30]. Coronary blood was not changed at a cumulative dose of 14x10<sup>6</sup>, but further injections after cumulative dose of 44 x 10<sup>6</sup> were associated with a progressive decrease in the coronary filling time culminating in hypokinesia of the anterior apical wall. With this data in mind, we chose to use infusions of 30x10<sup>6</sup> MSC (roughly corresponding to 1x10<sup>6</sup> MSC/kg) in the present study. This could be a suitable dose since there were no periprocedural complications with IC infusion of MSC and no hemodynamic deterioration, arrhythmias or compromised coronary epicardial vessel flow were observed.

Currently no IC delivery strategy has emerged as the optimal administration method for cell administration. Previous studies have used the stop-flow methodology as described by Strauer and co-workers [31], with slight variations between these. Briefly, with this technique a coronary vessel is occluded with an over-the-wire balloon and cells are injected through the central lumen of the balloon-catheter in several occlusion-reperfusion series. Theoretically this could avert cell backflow or rapid cell washout. On the other hand, this technique may lead to MSC accumulation, and even aggregation, increasing the risk of cell entrapping. Another disadvantage is the risk of coronary dissection with the balloon, particularly in non-stented vessels. In our experiment, human MSC were slowly infused using a microcatheter and an infusion pump syringe, at a constant flow and without coronary occlusion. We speculate that with this approach MSC are drifted towards the microcirculation in smaller numbers and at a constant rate, which potentially prevents or minimizes microvessel sludging. Our findings support that this continuous infusion with coronary flow maintained could potentially be a safer way of IC administration of MSC.



To our best knowledge, the present study is the first one to address the acute microcirculatory effects of IC MSC delivery using IMR measurements and a controlled and blind research design. IMR evaluation relies in a complex technique and our group previously performed its validation in a porcine model [32].

Here, MSC infusion resulted in a significant, but not so impressive, increase of IMR to  $15.3 \pm 3$  U. This suggests that several degrees of microcirculation compromise could be distinguished by IMR assessment, which could be useful towards the establishment of an optimal MSC dose scheme to study safety and efficacy. We believe that demonstrating changes in microcirculation, in vivo and in real time, after the intracoronary administration of these cells is not trivial, since we still lack the limits on what is normal or what defines an unwanted effect of any intervention. However, it can be the first step to clarify the potential clinical value of IMR in future studies.

We also observed a small increase in IMR at 5 minutes in control animals (*i.e.* no cells administered) that could be related to coronary manipulation during saline infusion. In fact, only after 30 minutes, a significant difference between groups occurs. This possibly means that we should wait before measuring IMR instead of doing it immediately after an intervention to assess acute effects of any procedure.

Hong and collaborators also addressed the microcirculatory effects of IC injections of adipose-derived stem cells with IMR measurements [30]. These authors reported a significant increase from baseline in IMR at 7 days in the high-dose group (receiving  $50 \times 10^6$  cells) ( $11 \pm 1.3$  vs.  $17.8 \pm 3.2$ ,  $p=0.04$ , respectively), and no significant changes in the low-dose group ( $10 \times 10^6$  cells). Despite the different MSC source (adipose) used and a distinct IC infusion technique (*i.e.* cells were delivered at a rate of 1.3 ml/min with alternating 3-min infusions and 3-min periods of reperfusion), our results are in line with those obtained by Hong and co-workers, which clearly demonstrates the potential for microvasculature obstruction with MSC IC delivery. The differences observed between the two studies, namely the more expressive increase in IMR observed in our work might be also the result of differences in the studied

population (healthy vs. post-myocardial infarction animals), and time of IMR assessment. In contrast to the previous work, our operators were blinded for the assessment of IMR, which avoids operator-induced bias.

Most importantly, CFR had no significant change, confirming that epicardial circulation was unaffected during the experiment and that IMR is a better and more specific parameter for microcirculation assessment.

### **Study limitations**

We used healthy animals with normal microcirculation and extrapolating our results to the context of heart disease should be done with caution. A histological study to confirm the presence of microvessel obstruction was not performed, and so we can only consider this as a hypothesis for the occurrence an increase in IMR. On the other hand, a side-by-side comparison between IC infusion techniques was not done and thus our results warrant further research.

Overall, IMR enables the assessment of the microcirculation status by Interventional Cardiologists. Correlating IMR values after IC delivery of MSC with data about cell fate and distribution, histological analysis and long term clinical benefit in the context of heart disease are important issues that should be addressed in future work.

### **Conclusion**

We demonstrate the feasibility of use IC delivery to administer culture-expanded human MSC without compromising hemodynamic, electrical stability and epicardial coronary flow. However, our study does provide definitive evidence of microcirculatory disruption exposed by a significant increase in IMR. The impact of these microcirculatory effects and the potential applications of IMR warrant further investigation.

### Acknowledgements

This work was financially supported by research funds from the Cardiology Department of Hospital de Santa Marta and by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), Portugal, through the project EXPL/BIM-MED/1970/2013 CARDIOSAFER and grants SFRH/BD/90001/2012 and SFRH/BD/51572/2011 awarded to M. F. Mata and I. N. Simões, respectively.

### References

1. Mendis S, Puska P, Norrving B editors. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. World Health Organization, Geneva.; 2011.
2. Mozid AM, Arnous S, Sammut EC, Mathur A (2011) Stem cell therapy for heart diseases. *Br Med Bull.* 2011; 98:143–159.
3. Lopes JP, Fiarresga A, Silva Cunha P, Feliciano J, Cruz Ferreira R. Mesenchymal stem cell therapy in heart disease. *Rev Port Cardiol.* 2013; 32(1):43–47.
4. Lennon DP, Caplan AL. Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.* 2006; 34 (11):1604-1605.
5. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods.* 2008; 45(2):115-120.
6. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman M, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284(5411):143-147.
7. Patel DM, Shah J, Srivastava AS (2013) Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cells Int.* 2013; 496218. doi:10.1155/2013/496218.

8. Hansson EM, Lindsay ME, Chien KR. Regeneration next: toward heart stem cell therapeutics. *Cell Stem Cell*. 2009; 5:364–377.
9. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006; 98:1076–1084.
10. Eggenhofer E, Franla L, Dahlke M, Hoogduijn. The life and fate of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:148. doi:10.3389/fimmu.2014.00148.
11. Fearon WF, Balsam LB, Farouque HM, Caffarelli AD, Robbins RC, Fitzgerald PJ, Yock PG, Yeung AC. Novel index for invasively assessing the coronary microcirculation. *Circulation*. 2003; 107(25): 3129–3132.
12. Dos Santos F, Andrade PZ, Eibes G, da Silva CL. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells on microcarriers. *Methods Mol Biol*. 2011; 698:189-198.
13. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4):315-317.
14. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Cir Res*. 2004; 95:9–20.
15. Bartunek J, Behfar A, Vanderheyden M, Wijns W, Terzic A. Mesenchymal stem cells and cardiac repair: principles and practice. *J Cardiovas Transl Res*. 2008; 1:115–119.
16. Kudo M. Implantation of bone marrow stem cells reduces the infarction and fibrosis in ischemic mouse heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2003; 35:1113–1119.

17. Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold E, Kloner RA. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation*. 2005; 112:214–223.
  
18. Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, Amado LC, Martin BJ, Pittenger MF, Hare JM, Bulte JM. In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Circulation*. 2003; 107:2290–2293.
  
19. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, Durand DJ, Fitton T, Kuang JQ, Stewart G, Lehrke S, Baumgartner WW, Martin BJ, Heldman AW, Hare JM. Cardiac repair with allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:11474–11479.
  
20. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib Nabil, Strumpf RK, Schulman SP, Gerstenblith G, DeMaria AN, Denktas AE, Gammon RS, Hermiller JB, Reisman MA, Schaer GL, Sherman W. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54:2277–2286.
  
21. Bartunek J, Behfar A, Dolatabadi D, Vanderheyden M, Ostojic M, Dens J, El Nakadi B, Banovic M, Beleslin B, Vrolix M, Legrand V, Vrints C, Vanoverschelde JL, Crespo-Diaz R, Homsy C, Tendera M, Waldman S, Wijns W, Terzic A. Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure: the C-CURE (Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failURE) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics. *J Am Coll Cardiol*. 2013; 61(23): 2329-2338.

22. Freyman T, Polin G, Osman H, Crary J, Lu MM, Cheng L, Palasis M, Wilensky RL. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2006; 27:1114–1122.
  
23. Perin EC, Silva G V, Assad JAR, Vela D, Buja LM, Sousa ALS, Litovsky S, Lin J, Vaughn WK, Coulter S, Fernandes MR, Willerson JT. Comparison of intracoronary and transendocardial delivery of allogeneic mesenchymal cells in a canine model of acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2008; 44:486–495.
  
24. Grieve SM, Bhindi R, Seow J, Doyle A, Turner AJ, Tomka J, Lay W, Gill A, Hunyor SN, Figtree G. Microvascular obstruction by intracoronary delivery of mesenchymal stem cells and quantification of resulting myocardial infarction by cardiac magnetic resonance. *Cir Heart Fail*. 2010; 3(3):e5–6.
  
25. Toma C, Wagner WR, Bowry S, Schwartz A, Villanueva F. Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observations of cell kinetics. *Circ Res*. 2009; 104:398–402.
  
26. Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet*. 2004; 363:783–784.
  
27. Wang D, Jin Y, Ding C, Zhang F, Chen M, Yang B, Shan Q, Zou J, Cao K. Intracoronary delivery of mesenchymal stem cells reduces proarrhythmogenic risks in swine with myocardial infarction. *Ir J Med Sci*. 2011; 180:379–385.
  
28. Houtgraaf JH, De Jong R, Kazemi K, Groot D, Van Der Spoel TG, Arslan F, Hoefer IE, Pasterkamp G, Itescu Si, Geleijnse M, Zijlstra F, Serruys PW, Duckers HJ. Intracoronary

Infusion of Allogeneic Mesenchymal Precursor Cells Directly Following Experimental Acute Myocardial Infarction Reduces Infarct Size, Abrogates Adverse Remodeling and Improves Cardiac Function. *Cir Res.* 2013; 113(2):153-166.

29. Llano R, Epstein S, Zhou R, Zhang H, Hamamdžić D, Keane MG, Freyman T, Wilensky RL. Intracoronary delivery of mesenchymal stem cells at high flow rates after myocardial infarction improves distal coronary blood flow and decreases mortality in pigs. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2009; 73:251–257.

30. Hong SJ, Hou D, Brinton TJ, Johnstone B, Feng D, Rogers P, Fearon WF, Yock P, March KL. Intracoronary and retrograde coronary venous myocardial delivery of adipose-derived stem cells in swine infarction lead to transient myocardial trapping with predominant pulmonary redistribution. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2012; 1;83 (1): E17-25.

31. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kosterling M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Repair of Infarcted Myocardium by Autologous Intracoronary Mononuclear Bone Marrow Cell Transplantation in Humans. *Circulation.* 2002; 106:1913–1918.

32. Fiarresga A, Selas M, Oliveira E, Cavaco-Gonçalves S, Cacela D, Carrapiço B, Cardim N, Cruz Ferreira R. Invasive assessment of the coronary microcirculation using the index of microcirculatory resistance: Description and validation of an animal model. *Rev Port Cardiol.* 2014; 33:207-212.

#### CAPTIONS

**S1 Supporting Information.zip 1** Tables with all the relevant research results.

### CONFLICT OF INTEREST

None declared.



# AGRADECIMENTOS

---



### **XII. AGRADECIMENTOS**

---

Em primeiro lugar quero agradecer a toda a minha família, que tem passado por momentos difíceis nestes últimos anos. Em particular aos meus pais, por tudo; ao meu irmão, pela sua amizade; à minha esposa, pelo seu amor; e aos meus filhos por cada dia que tenho a sorte de estar com eles. Aos meus sogros pela amizade e pela ajuda na logística da impressão da Tese.

Este trabalho só foi possível devido ao apoio, manifestado desde o início, pelo meu Diretor de Serviço, o Dr. Rui Cruz Ferreira. A sua visão de que investigação é algo de institucional e não um assunto individual, tem servido de motivação e tem alicerçado vários doutoramentos, sendo este mais um exemplo.

Ao meu orientador, o Professor Doutor Nuno Cardim, agradeço a ajuda na escolha das opções mais ponderadas e sensatas, a motivação nos momentos mais difíceis e a amizade com que me acolheu.

Agradeço à Doutora Belmira Carrapiço, à Doutora Sandra Cavaco-Gonçalves, à Enfermeira Mafalda Selas e à Técnica de Cardiopneumologia Eunice Oliveira – co-autoras dos trabalhos e companheiras das infindáveis horas passadas no Laboratório de Hemodinâmica, amenizadas pela boa disposição e pela camaradagem, apenas encontradas nas boas equipas. Só com o seu esforço, rigor e profissionalismo se conseguiu finalizar com sucesso os mais de 100 cateterismos realizados.

Repito o agradecimento à Doutora Sandra Cavaco-Gonçalves pelo seu valioso contributo na revisão do manuscrito da Tese.

O meu reconhecimento vai também para a Professora Engenheira Cláudia Lobato da Silva, co-investigadora, e sobretudo uma boa amiga que me

ajudou neste percurso. Este agradecimento estende-se também aos restantes membros do Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia do Instituto superior Técnico, em particular ao seu líder, o Professor Engenheiro Joaquim Sampaio Cabral, e às investigadoras Márcia Mata, Irina Simões e Ana Fernandes-Platzgummer.

À Professora Doutora Conceição Peleteiro, ao Doutor Hugo Piçarra e à Técnica Sandra Carvalho, devo toda a orientação e trabalho relacionado com o estudo anatomopatológico e histológico dos animais.

Agradeço ao André Lourenço e à empresa Minalytics o apoio no trabalho estatístico.

Apesar de ter tentado manter sempre as obrigações inerentes ao meu trabalho assistencial, tenho muito a agradecer aos os meus colegas do Hospital de Santa Marta, por pontualmente terem estando onde eu não estive, terem feito o que eu não podia fazer e por o fazerem com compreensão e amizade.

A empresa St. Jude Medical Portuguesa apoiou os trabalhos com a dispensa da consola e de alguns fios de pressão, além disso contámos sempre com o entusiasmo da sua colaboradora Liliana Vitorino. A empresa WorldMedica forneceu as microesferas. A ambas o meu reconhecimento por este apoio à investigação.